

**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE  
RELICTOS DE  
*Guadua angustifolia*, UN ECOSISTEMA  
ESTRATÉGICO DE LA ECOREGIÓN VALLE  
DEL CAUCA MEDIANTE STR´s**

**TESIS DOCTORAL**  
CARLOS ANDRES PEREZ GALINDO  
Sevilla, 2014



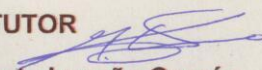
**CARACTERIZACIÓN GENÉTICA DE  
RELICTOS DE  
*Guadua angustifolia*, UN ECOSISTEMA  
ESTRATÉGICO DE LA ECOREGIÓN VALLE  
DEL CAUCA MEDIANTE STR's**

Memoria presentada por el  
Biólogo CARLOS ANDRES PEREZ  
GALINDO para optar al título de  
Doctor en Biotecnología,  
Ingeniería y Tecnología Química  
por la Universidad Pablo de  
Olavide de Sevilla.

DIRECTOR:

  
Fdo. Dr. Heiber Cardenas Henao

TUTOR

  
Fdo. Dr. Modesto Luceño Garcés

## AGRADECIMIENTOS

A mi madre Carmenza, abuelos, hermana, sobrino y toda mi familia que siempre ha estado allí, apoyándome en todos los procesos de materialización de mis ideas.

Al profesor Heiber Cardenas, que siempre me incentivo a ir más allá en las diferentes investigaciones y en los proyectos que emprendimos, que han estado enmarcados en la construcción de nuevos programas de postgrado en Colombia, estudios en biodiversidad de nuestra gran región Vallecaucana y la puesta en marcha de diferentes proyectos para el mejoramiento formativo en ciencias biológicas de los jóvenes colombianos.

A la Universidad Pablo de Olavide por el apoyo no solo académico, sino también económico en mi etapa como becario. A su excelente cuerpo profesoral, que mediante sus enseñanzas me permitieron ampliar no solo mis conocimientos en biotecnología, sino también mi visión sobre la vida, incentivándome a realizar mis estudios de postgrado en bioinformática, lo cual me permitiría tratar de entender la evolución desde la óptica molecular.

Al Dr. Modesto Luceño, quien tomaría la tutoría de este importante trabajo doctoral, apoyándome en los diferentes procesos y requerimientos para la presentación de la tesis y comprendiendo las dificultades que se tienen al trabajar a distancia.

A la Universidad Santiago de Cali, institución que apoyó económica, logística y moralmente la investigación objeto de este trabajo. Cuyo principal objetivo ha estado centrado en recurrir a la investigación social y científica para la defensa de la biodiversidad de cultivos nativos en una región agroindustrial, regida por los monocultivos de azúcar y que ve como la afectación de la biodiversidad incide de manera negativa en la calidad de las tierras y la disponibilidad de recursos hídricos, lo cual hoy por hoy está afectando a los habitantes de estas zonas.

A INCIVA, instituto de fomento de conservación del patrimonio natural del Valle del Cauca, por su acompañamiento en todo el proceso de muestreo y censo de nuestra *Guadua* vallecaucana. Ojala los políticos entendieran que la ciencia y la educación son poderosas herramientas para el planteamiento y desarrollo de políticas de buen vivir y convivencia.

A todos que mediante su trabajo desinteresado y buen ánimo aportaron un grano de arena para que este importante proyecto se pudiese desarrollar en sus diferentes etapas.

## *Índice*

---



# Índice de Contenidos

---

	<i><b>Página</b></i>
CAPÍTULO 1. – INTRODUCCIÓN	1
Motivación y objetivos	5
Programa 1. Recolección y siembra de material vegetal.	6
Programa 2. Evaluación de las colecciones vivas.	6
Programa 3. Caracterización molecular.	7
Programa 4. Capacitación y educación.	7
Programa 5. Desarrollo organizacional y empresarial.	8
1. Estructura de la Tesis doctoral - Antecedentes taxonómicos, citogenéticos, filogenéticos, distribución geográfica e importancia	9
1.1. Antecedentes taxonómicos.	9
1.1.1. Aspectos morfológicos.	9
1.1.1.1. Renuevos.	13
1.1.1.2. Culmo entrenodal y nodal.	15
1.1.1.3. Brácteas del culmo y ramas.	17
1.1.1.4. Lámina y vaina de la hoja.	18
1.1.1.5. Ramas.	19
1.1.1.6. Hojas.	21
1.1.1.7. Inflorescencia y flores.	22
1.1.2. Aspectos anatómicos.	25
1.1.2.1. Esclerenquima y parénquima.	27
1.1.2.2. Bandas vasculares.	29
1.1.2.3. Fibras.	30
1.1.2.4. Grosor de la pared del culmo.	32
1.1.2.5. Aspectos taxonómicos.	36
1.2. Antecedentes citogenéticos.	45
1.3. Antecedentes filogenéticos moleculares.	48
1.4. Distribución Geográfica.	51
1.5. Importancia.	55
1.5.1. Importancia Ambiental.	55
1.5.2. Importancia Ecológica.	57
1.5.3. Importancia Socio-Cultural.	58
1.5.4. Importancia Económica.	59

## Continuación del Índice de Contenidos

---

	<b>Página</b>
1.6. Condiciones ambientales para el desarrollo y cultivo de la guadua ( <i>Guadua angustifolia</i> Kunth).	60
1.6.1. Temperatura.	60
1.6.2. Latitud.	60
1.6.3. Precipitación.	60
1.6.4. Humedad Relativa.	61
1.7. Referencias.	61
CAPÍTULO 2. Diversidad Morfológica de <i>Guadua angustifolia</i>	68
Resumen.	68
2.1. Introducción.	70
2.2. Materiales y Métodos.	71
2.2.1. Recolección de material.	71
2.2.2. Registro morfométrico.	77
2.2.3. Evaluación de crecimiento y desarrollo.	77
2.2.4. Análisis morfométrico en <i>Guadua angustifolia</i> Kunth del Departamento del Valle del Cauca.	80
2.2.5. Especies colombianas.	81
2.2.6. Variedades de <i>Guadua angustifolia</i> .	82
2.2.7. Enriquecimiento de banco de germoplasma.	84
2.3. Resultados.	84
2.3.1. Registro morfométrico.	87
2.3.2. Variables de interés relacionadas con el aprovechamiento de la parte útil de la Guadua.	88
2.3.3. Estadística Inferencial.	92
2.3.3.1. Matriz de Correlación.	92
2.3.3.2. Análisis Discriminante.	97
2.4. Discusión.	108
2.5. Referencias.	111
CAPITULO 3. Estimación de la diversidad genética en los rodales naturales de <i>Guadua angustifolia</i> (Poaceae: Bambusoideae) en el Valle del Cauca- Colombia, para el uso sostenible y conservación de este recurso genético.	114
Resumen.	114
3.1. Introducción.	115
3.2. Materiales y Métodos.	122
3.2.1. Colecta del Material Vegetal.	122
3.2.2. Estandarización del protocolo de extracción de ADN de <i>Guadua angustifolia</i> .	123

## Continuación del Índice de Contenidos

---

	<b>Página</b>
3.2.3. Extracción y cuantificación del ADN.	123
3.2.4. La clonación y el aislamiento de clones microsatélites.	125
3.2.5. Estandarización de las condiciones de PCR para los marcadores microsatélites.	161
3.2.6. Condiciones finales de amplificación de las regiones microsatélites.	172
3.2.7 Evaluación de los microsatélites.	173
3.2.8 Amplificación de los sistemas microsatélites.	175
3.2.9 Análisis estadístico de los Datos.	175
3.2.10 Diversidad Genética.	176
3.2.11 Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).	180
3.2.12 Relaciones genéticas entre los individuos.	180
3.3. Resultados y discusión.	181
3.3.1. Extracción y cuantificación del ADN.	181
3.3.2. Extracción Amplificación de las regiones microsatélites.	181
3.3.3. Evaluación de los microsatélites.	184
3.3.4. Diversidad de los SSR.	192
3.3.5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).	195
3.3.6. Relaciones genéticas entre los individuos.	198
Agradecimientos.	200
Referencias.	202
Anexo 3.1. Protocolo de Extracción Dellaporta 1983 modificado para <i>Guadua angustifolia</i> .	210
CAPITULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES	212
Resumen.	212
4.1. Introducción.	215
4.2. Diversidad morfológica de <i>Guadua angustifolia</i> .	216
4.2.1 Condiciones ambientales para el desarrollo y cultivo de la guadua ( <i>Guadua angustifolia</i> ).	216
4.3. Diversidad genética de rodales naturales de <i>Guadua angustifolia</i> .	221
4.3.1. Introducción.	221
4.3.2. Diversidad Genética.	227

## *Continuación del Índice de Contenidos*

---

	<b><i>Página</i></b>
4.3.3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA).	230
4.4. Conclusiones.	239
4.5. Recomendaciones.	242
4.6. Agradecimientos.	243
4.7. Referencias.	244
Anexos relacionados con los productos alcanzados durante el desarrollo de esta investigación.	250

## Índice de Tablas

---

	<i>Página</i>
Tabla 1.1. Porcentaje de diferentes tejidos en el culmo de <i>G. angustifolia</i> a la edad de 48 meses (Londoño et al. 2002).	26
Tabla.1.2. Características anatómicas de los haces vasculares de acuerdo a la edad y a las zonas de engrosamiento de la pared del culmo (Londoño et al. 2002).	34
Tabla 1.3. Variación del engrosamiento de la pared entrenodal con la edad del culmo (Londoño et al. 2002).	35
Tabla 1.4. Variación en el engrosamiento de la pared del entrenudo, diámetro y largo del entrenudo a lo largo de 48 meses en un culmo viejo (Londoño et al. 2002).	35
Tabla.1.5. Características anatómicas del haz vascular a lo largo del culmo, y a través del engrosamiento de la pared (Londoño et al. 2002).	36
Tabla 1.6. Especies del género <i>Guadua</i> , especialmente de culmos erectos, se anota también su distribución.	39
Tabla 1.7. Comparación morfológica de <i>Guadua angustifolia</i> subsp. <i>angustifolia</i> y de otras especies simpátricas de guadua (Young y Judd 1992).	44
Tabla 1.8. Comparación morfológica de <i>Guadua angustifolia</i> subsp. <i>chocoensis</i> y de otras especies simpátricas de guadua (Young y Judd 1992).	45
Tabla 2.1. Sitios de colecta georeferenciados de <i>Guadua angustifolia</i> .	72
Tabla 2.2. Frecuencias absolutas y relativas (%) de los cuatro biotipos de <i>Guadua angustifolia</i> y de dos especies estudiadas de este género en el Valle del Cauca.	85
Tabla 2.3. Características de las áreas de estudio. Donde M: O significa contenido de materia orgánica del suelo.	86
Tabla 2.4. Relación del material sembrado en la localidad El Bijal.	87
Tabla 2.5. Caracterización morfométrica de los ecotipos de <i>Guadua angustifolia</i> colectados en el año 2007 (Colección viva del Jardín Botánico José María Céspedes- Tuluá, Valle.	90
Tabla 2.6. Caracterización morfométrica de los ecotipos colectados en el año 2007 (Especímenes del Herbario, Jardín Botánico José María Céspedes- Tuluá, Valle).	91
Tabla 2.7. Estadística descriptiva de las variables analizadas en este estudio para los tres biotipos de <i>Guadua angustifolia</i> . El número total de individuos analizados fue 73; no hubo datos perdidos.	93

## Índice de Tablas

	<b>Página</b>
Tabla 2.8. Matriz de correlación (r) entre parejas de variables cuantitativas medidas en <i>Guadua angustifolia</i> kunth del Valle Cauca.	98
Tabla 2.9. Valores medios de las variables estudiadas en cada uno de los Biotipos de <i>Guadua angustifolia</i> . Donde 1: Castilla; 2= Cebolla, 3= Macana, 7 = Bicolor y en las especies 4 = <i>G. uncinata</i> , 5 = <i>Guadua amplexifolia</i> y 6 = <i>Guadua glauca</i> .	100
Tabla 2.10. Prueba unidimensional de igualdad de las medias para cada uno de los Biotipos de <i>Guadua angustifolia</i> . Donde 1: Castilla; 2= Cebolla, 3= Macana, 7 = Bicolor y en las especies 4 = <i>G. uncinata</i> , 5 = <i>Guadua amplexifolia</i> y 6 = <i>Guadua glauca</i> .	101
Tabla 2.11. Distancias de Fisher (debajo de la diagonal) y valores de probabilidad (P). Donde 1: Castilla; 2= Cebolla, 3= Macana, 7 = Bicolor y en las especies 4 = <i>G. uncinata</i> , 5 = y 6 = <i>Guadua glauca</i> .	102
Tabla 2.12. Valores propios y porcentaje de discriminación aportado por cada factor.	102
Tabla 2.13. Matriz de confusión para los resultados de validación cruzada	103
Tabla 2.14. Resumen de la selección de las variables incluidas en el modelo por la regresión sobre la variable Biotipo (Forma). Donde IN significa variable incluida y OUT Excluida.	105
Tabla 2.15. (A) Análisis de la varianza con las variables escogidas Calculado contra el modelo Y = Media (Y). (B) Suma de cuadrados del análisis Tipo I se indica debajo de la ANOVA. (C) Parámetros del modelo con su significancia.	106
Tabla 3.1. Muestras de <i>Guadua angustifolia</i> colectadas en diferentes localidades del Valle del Cauca.	124
Tabla 3.2. Lista de microsatélites amplificados con esta estandarización.	171
Tabla 3.3. Microsatélites estandarizados en las diferentes especies de los géneros <i>Guadua</i> y <i>Bambusa</i> con la temperatura de anillamiento de <i>G. angustifolia</i> .	174
Tabla 3.4. Código de accesoión en el Genbank de los ocho loci microsatélites evaluados y reportados por Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (Pérez-Galindo et al.2009).	177
Tabla 3.5. Microsatélites estandarizados óptimamente en cada especie de <i>Guadua</i> y <i>Bambusa</i> .	184
Tabla 3.6. Frecuencias alélicas obtenidas con los ocho loci en las 46 accesiones de <i>G. angustifolia</i> .	185
Tabla 3.7. Estimadores descriptivos de la diversidad genética obtenidos para 8 sistemas microsatélites evaluados en las accesiones de <i>G. angustifolia</i>	189
Tabla 3.8. Alelos únicos encontrados en los biotipos de <i>G. angustifolia</i> para los ocho loci.	190
Tabla 3.9. Estimadores de la diversidad genética en cada uno de los SSR en la población global.	192

## Continuación Índice de Tablas

---

	<i><b>Página</b></i>
Tabla 3.10. Estimadores de la diversidad genética en cada una de las poblaciones.	193
Tabla 3.11. Resultados de prueba $X^2$ para probar equilibrio Hardy-Weinberg por cada uno de los loci analizados.	194
Tabla 3.12. AMOVA de tres niveles realizada mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{ST}$ ).	195
Tabla 3.13. Índices de fijación estimados mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{ST}$ ).	195
Tabla 3.14. AMOVA de tres niveles realizada mediante el modelo de Wright (1935).	196
Tabla 3.15. Índices de fijación estimados mediante el modelo de Wright (1935).	196
Tabla 3.16. AMOVA de dos niveles realizada mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{ST}$ ).	197
Tabla 3.17. AMOVA de dos niveles realizada mediante el modelo de Wright (1935).	197

## Índice de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1.1. Proceso metodológico del proyecto dividido en fases según el cronograma establecido y el compromiso de las instituciones participantes.	10
Figura. 1.2.1. Rizoma paquimorfo (Recht y Wetterwald 1988).	10
Figura 1.2A.1. Rizoma paquimorfo (Recht y Wetterwald 1988).	11
Figura 1.2.2. Pares del rizoma: a) cuello del rizoma; b) primordio de raíces; c) raíces adventicias; d) cuello; e) yema (Giraldo y Sabogal 1999).	11
Figura1.2A.2. Cuellos del rizoma de <i>G. angustifolia</i> con elongación geotrópica positiva (Recht y Wetterwald 1988).	12
Figura 1.2.3. Sistema rizomatoso de crecimiento simpodial (Young y Judd 1992).	12
Figura 1.2A.3. Interconexión de rizomas de guadua (Giraldo y Sabogal 1999).	13
Figura 1.2.4. Renuevo o chusquín. Foto de D. Morales.	14
Figura1.2A1. Renuevo (Giraldo y Sabogal 1999).	15
Figura1.2A2. Renuevo (Giraldo y Sabogal 1999).	15
Figura 1.2.5. Partes del Tallo de Agua: a') banda nodal; b') nudo; a) cicatriz; b) parte superior del nudo; c) cicatriz de la vaina; d) entre nudo; e) diafragma (Giraldo y Sabogal 1999).	16
Figura 1.2.6. Crecimiento ascendente o erecto con dirección vertical de un culmo de <i>G. angustifolia subsp. angustifolia</i> , obsérvese la tendencia oblicua en su parte apical (Villegas 2003; Young y Judd 1992).	17
Figura 1.2.7. Partes de una bráctea del culmo de <i>G. angustifolia</i> : a) lámina; b) lígula; c) Vaina (Giraldo y Sabogal 1999).	18
Figura 1.2.8. Yema nodal (Giraldo y Sabogal 1999).	19
Figura 1.2.9. Espinas de la rama (Giraldo y Sabogal 1999).	19
Figura 1.2.10. Posición de las ramas en el cuello: b) Superiores, y c) inferiores o bajas (Giraldo y Sabogal 1999).	20
Figura 1.2.11. Ramas inferiores o basales, conocidas como riendas (Giraldo y Sabogal 1999).	21
Figura 1.2.12. Inflorescencia de <i>G. angustifolia</i> Desarrollo de la inflorescencia (unión de inflorescencias) con una extensión de una ramita o desde una yema lateral; círculos vacíos = floretes fértiles; círculos rellenos = yemas vegetativas; banderola doble = prófalo; línea curvada con punta en garfio = vaina de la hoja de la rama y lámina, respectivamente; sólo línea curvada = brácteas; brácteas gemíparas, lema o gluma; línea contorsionada = partes del eje terminal abortado (Young y Judd 1992).	22



## Continuación del Índice de Figuras

	<i><b>Página</b></i>
Figura 1.2.13. Pseudoespigilla de <i>G. angustifolia</i> ). a. florescencia principal; b. ramificación de yemas vegetativas de la florescencia principal para formar una sinflorescencia, constituida por una florescencia principal y dos coflorescencias. Círculos vacíos = floretes fértiles; círculos rellenos = yemas vegetativas; banderola doble = prófalo; línea curvada con punta en garfio = vaina de la hoja de la rama y lámina; respectivamente, solo línea curvada = brácteas; brácteas gemíparas; lema o gluma; línea contorsionada = parte del eje terminal abortado (Young y Judd 1992).	24
Figura 1.2.14A. Componentes de la flor. a) Estilo; b) estigma; c) filamento; d) ovario; e) lodícula; f) antera (Giraldo y Sabogal 1999)	24
Figura 1.2.15. Sección transversal de la pared del culmo de <i>G. angustifolia</i> . Micrografía óptica de transmisión y florescencia. Fotos de Gritsch et al. 2004.	25
Figura 1.2.16. Sección longitudinal del culmo de <i>G. angustifolia</i> . La microfotografía muestra el parénquima compuesto por células cortas y largas, y fibras de esclerénquima (Londoño 2002).	27
Figura 1.2.17. Sección transversal del culmo de <i>Guadua angustifolia</i> . Micrografía Electrónica de Barrido (Montiel 2004).	28
Figura 1.2.18. Sección trasversal de un culmo de <i>G. angustifolia</i> . La micrografía óptica muestra un haz vascular (Londoño 2002).	29
Figura 1.2.19. Variación en el engrosamiento de la pared celular de la fibra de acuerdo a la posición en el culmo y a la edad. Jardín Botánico Universidad tecnológica de Pereira, Risaralda – Colombia. Culmos de Rizoma viejo. Cada punto es el promedio de 300 observaciones, barras: error estándar (Gritsch y Murphy 2004).	31
Figura 1.2.20. Engrosamiento dela pared celular delas fibras en relación con la edad: a) Fibras de pared delgada (F) en culmos menores de 6 meses; las flechas indican cuerpos de silicio; b) paredes celulares engrosadas en culmos de tres años, c) culmos mayores a 8 años, con signos de degradación por hongos (tinción azul indicado con flecha). Micrografía óptica de transmisión y fluorescencia. Fotos de (Gritsch y Murphy 2004).	31
Figuras 1.2.21. Estructura anatómica del culmo de <i>G. angustifolia</i> . Arriba, a) Sección trasversal, b) detalle de un haz vascular. Abajo, a) corteza, b) detalle de un estoma, c) detalle de la célula silíceo. Microscopía óptica (Londoño et al. 2002).	32

## Continuación del Índice de Figuras

	<b>Página</b>
Figura 1.2.22. Sección transversal del culmo; se muestra la variación en el grosor de la pared (Wall thickness) del culmo durante 48 meses sobre un único culmo en 68 entrenudos (Londoño et al. 2002).	33
Figura 1.2.23. Taxonomía del género <i>Guadua</i> (Londoño 1998).	38
Figura 1.2.24A. <i>G. angustifolia</i> . A. bráctea del culmo vista por el lado interno; B. detalle ampliado de la base de la bráctea del culmo; C. porción superior de la bráctea del culmo vista por la cara externa; D. porción de las ramas de primer orden en las cuales se observan espinas; E. ápice de la bráctea de la hoja y base de la hoja; F. nudo del tallo con la yema de las ramas; G. brote de una rama espinosa en un nudo inferior del tallo (Hidalgo 1974).	40
Figura 1.2.24B. <i>G. angustifolia</i> . A. rama florecida; B. rama estéril; C. par de pseudoespigas; D. diagrama de la sección longitudinal de una pseudoespiga; E. bráctea y yema; F. flósculo; G. complemento de la lodícula; H. estambres; J. diagrama de la sección transversal del flósculo; K. fruto, lado del embrión; L. fruto, lado del folículo (Hidalgo 1974).	41
Figura 1.2.24C. <i>G. angustifolia</i> . A. base del culmo con su rizoma; B. corte tangencial del internudo y nudos; C. sector de la sección transversal de la pared del tallo; D. ápice de la bráctea del culmo, vista por el lado interno; E. parte basal de las ramas de primer orden de un nudo intermedio del culmo que muestra yemas intactas; F. ramas de segundo orden con yemas aún intactas; G. ramas de tercer orden mostrando espigas y follaje; H. complemento de la espina con una rama que sale del nudo más próximo a la espina; I y J. ejemplos de formas de hojas; K. ápice de la bráctea de la hoja y base de la misma (Hidalgo 1974).	42
Figura 1.2.25. Microfotografías de cromosomas metafásicos de <i>G. angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i> A. en contraste de fases. B y C Tinción con DAPI, conteo cromosómico realizado con el Software LUCIA. Campo visual 100X. Tomado de Valencia et al (2012).	47
Figura 1.2.26 Cariotipo e ideograma de <i>Guadua angustifolia</i> var. <i>angustifolia</i> biotipo macana, según la posición relativa del centrómero (100X). Tomado de Valencia et al (2012).	47
Figura 1.2.27. Distribución natural del género <i>Guadua</i> , género de origen americano (Judziewicz et al. 1999)	51
Figura 1.2.28. Distribución de las poblaciones nortañas (America Central) de <i>Guadua</i> sub.sp. <i>angustifolia</i> . Círculos = plantas nativas, triángulos = plantas posiblemente cultivadas (Young y Judd 1992).	52

## Continuación del Índice de Figuras

	<i><b>Página</b></i>
Figura 1.2.29. Distribución de las poblaciones sureñas (noroeste de América del Sur) de <i>Guadua</i> sub.sp. <i>angustifolia</i> . Círculos solos = distribución oeste; círculo dentro de círculo = distribución este, triángulos = plantas posiblemente cultivadas (Young y Judd 1992).	53
Figura 1.2.30. Cultivo de guadua en la zona cafetera de Colombia. Tomado de “el bambú como material estructural, análisis de un caso práctico. Escuela Politécnica Superior.	54
Figura 2.1. Extracción de rizomas de guadua.	76
Figura 2.2. Estados de desarrollo vegetativo del culmo de guadua: a) renuevo, b) renuevo de edad avanzada, c) guadua joven, d) guadua sobremadura, e) guadua seca. (Fotos de D. Morales; Giraldo y Sabogal 1999).	80
Figura 2.3. Evaluación morfométrica de <i>Guadua angustifolia</i> .	88
Figura 2.4. Variedades y formas de <i>Guadua angustifolia</i> .	89
Figura 2.5. Valores propios y porcentaje de discriminación aportado por cada factor.	103
Figura 2.6. Representación gráfica de las observaciones con base en los ejes 1 y 2.	104
Figura 3.1. Evaluación de la serie 1 de cebadores de microsatélites. El autorradiograma muestra cada par de cebadores usando 4 de los 13 individuos analizados (1.1, 1.2, 1.3 y 1.4).	159
Figura 3.2a. Evaluación de la segunda serie de cebadores microsatélites. El autorradiograma muestra cada par de cebadores utilizando 8 de los 12 ADNs (2.1 a 2.8). Cada pareja de cebadores se indica en la parte inferior de cada panel y ADN genómico se indican 1-8 de izquierda a derecha a través del gel. El número aproximado de alelos para cada marcador están indicados en el fondo.	160
Figura 3.2b. Evaluación de la segunda serie de cebadores microsatélites. El autorradiograma muestra cada par de cebadores utilizando 8 de los 13 ADNs (2.1 a 2.8). Cada pareja de cebadores se indica en la parte inferior de cada panel y los DNAs genómicos son de izquierda a derecha a través del gel (1-8). Nótese que cebador 2-8 se repite en la figura 3.2a).	161
Figura 3.3. Evaluación del microsatélite Bam 2-13 en un gel de agarosa 1.0 %.	164
Figura 3.4. Evaluación del microsatélite Bam 2-11 en un gel de agarosa 1.0 %.	164
Figura 3.5. Evaluación de los microsatélites Bam 1-1, Bam 1-15 y Bam 9-2 en un gel de agarosa 1,0 %.	165
Figura 3.6. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 2-1, Bam 1-22, Bam 1-14 y Bam 1-11 en gel de agarosa al 1.5%.	165
Figura 3.7. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 1-1, Bam 2-8, Bam 2-2 y Bam 2-7 en gel de agarosa al 1.5%.	166

## Continuación del Índice de Figuras

	<i>Página</i>
Figura 3.8. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 1-15, Bam 9-2 y Bam 10-2 en gel de agarosa al 1.5%.	167
Figura 3.9. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 2-12, Bam 17-2, Bam 1-8, Bam 1-5 en gel de agarosa al 1.5%.	168
Figura 3.10. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 2-7, Bam 2-4, Bam 1-11, Bam 11-2 en gel de agarosa al 1.5%.	169
Figura 3.11. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 1-5, Bam 2-13, Bam 2-11, Bam 1-3 en gel de agarosa al 1.5%.	170
Figura 3.12. Visualización del ADN genómico de <i>G. angustifolia</i> A. mediante el protocolo de micro extracción de Dellaporta (1983) con modificaciones para arroz y posteriormente modificado para <i>G. angustifolia</i> por Potosí et al. (2006). B. mediante kit de Quiagen y protocolo de <i>Cucurbita</i> (Brown & Myers 1998).	181
Figura 3.13. Amplificación de microsatélites. A. Amplificación del locus Bam 2-13 en <i>G. angustifolia</i> (1- 3, 6- 11) y <i>B. vulgaris</i> (4, 5). B. Bam 1-11 en <i>G. angustifolia</i> (1-18) y <i>B. vulgaris</i> (3).	182
Figura 3.14. Visualización de geles de acrilamida al 4% para la identificación de los alelos de los loci A. Bam 2-13 y B. Bam 2-11( <i>Bambusa</i> : 1, 2, 3)	182
Figura 15. Perfil de bandas obtenidas con el locus Bam 2-11 en geles de acrilamida al 4%.	183
Figura 3.17. Comparación entre el contenido informativo polimórfico (PIC) y la probabilidad de identidad (I) obtenidos con ocho loci en las 46 accesiones de <i>G. angustifolia</i> .	190
Figura 3.18. Dendrograma desarrollado mediante UPGMA de las distancias genéticas calculadas mediante el coeficiente de Nei-Li (1979).	201

# CAPÍTULO 1.

## INTRODUCCIÓN

El incremento de la destrucción de los bosques del planeta, el calentamiento global y la dependencia de la población mundial de unas pocas especies de plantas, han llevado a la pérdida de diversidad genética. Esta situación ha alertado a la mayoría de los países del mundo y existe la necesidad de salvar esta diversidad natural. De allí que la exploración, recolección y manejo de la diversidad genética tenga gran importancia. El diagnóstico reciente sobre el estado de biodiversidad en Colombia indica que varios de los ecosistemas se encuentran seriamente amenazados con alto riesgo de pérdida de los recursos genéticos, razón por la cual se hace necesario caracterizar y evaluar los materiales colectados para su conservación y posterior utilización en programas de mejoramiento (Romero et al. 2008).

Ante el déficit cada vez mayor de madera, los bambúes pasan a ser una alternativa viable y un producto no forestal que puede contribuir a mejorar los niveles de vida de los pobladores del campo en países tropicales y subtropicales del mundo. El uso de *Guadua angustifolia* como sustituto de la madera, no solamente puede garantizar la permanencia de las selvas y la biodiversidad, sino que contribuye sustancialmente al mejoramiento del ecosistema y al desarrollo socio-económico, además, es la única especie de bambú en América identificada con un gran potencial para fijar dióxido de carbono atmosférico (Riaño et al. 2002).

En Colombia, aproximadamente 100.000 personas derivan su sustento del aprovechamiento, manejo y comercialización de la guadua (Giraldo y Sabogal 1999). Entre 1993 y 2002 la guadua generó recursos que ascendieron a 8.611 millones de pesos (Mejía 2004). Hasta el momento, El 100% de las reforestaciones con bambú se han hecho con la especie *G. angustifolia*. En el valle del río Cauca existen aproximadamente 5.000 ha cultivadas y 23.000 ha naturales. Sus características físico-mecánicas la convierten en un recurso natural no maderable de grandes perspectivas para promover procesos de desarrollo sostenible, sin

deteriorar el capital natural, además, es un verdadero sustituto de la madera (Londoño 2006).

La mayoría de las colecciones de bambúes en América se encuentran en jardines botánicos que reúnen un gran número de especies introducidas del Asia, caracterizándose por la poca representatividad de las especies nativas. Sin embargo, la colección del Jardín Botánico Juan María Céspedes ubicado en Tuluá (Valle del Cauca), se ha especializado en el género *Guadua* y ha contribuido a asegurar la diversidad genética de este bambú nativo (Judziewicz et al. 1999). Esta colección establecida posee 45 entradas de *Guadua angustifolia* provenientes de 16 departamentos de Colombia, además, reúne otras especies del género como *Guadua amplexifolia* Presl, *Guadua weberbaueri* Pilger y nuevas especies descritas como *Guadua uncinata* Londoño y Clark y *Guadua macrospiculata* Londoño y Clark (Londoño y Clark 2002). El establecimiento de bancos de germoplasma ha contribuido a la conservación del recurso, sin embargo, no se conoce el estado de la diversidad genética de poblaciones de *Guadua* del Valle del Cauca.

El problema del agotamiento del recurso *Guadua* se ha denunciado desde hace mucho tiempo por diferentes organismos nacionales. Sin embargo, hace poco tiempo que la *Guadua* viene siendo tratada como objeto de investigación. Entidades estatales y grupos privados se han encargado de recuperar la *Guadua* con diversos fines. Las corporaciones regionales, se ocupan de la producción, manejo técnico y silvicultura, recuperación, promoción, difusión y control. A pesar que se reconoce a Colombia internacionalmente como país pionero en sistemas constructivos con bambú, la falta de materia prima uniforme y de buena calidad, que garantice la durabilidad de las construcciones en el tiempo, es una desventaja que afronta el sector de la construcción y la cadena de la *Guadua*. Se ha propuesto que estas variaciones en la calidad de los materiales pueden deberse al componente genético de los materiales utilizados (Muñoz y Londoño 2011).

Un factor importante para la conservación de poblaciones naturales de cualquier especie es el entendimiento de su estructura genética, lo cual se convierte en una

herramienta básica para la planificación estratégica de su conservación y uso sostenible (Romero et al. 2008). La estructura genética de las poblaciones hace referencia a la distribución específica de alelos o genes para una población o un grupo en particular. En Colombia se han realizado estudios de diversidad de bambúes (Londoño 1990) y estudios con marcadores moleculares (Marulanda et al. 2002; Marulanda et al. 2007; Potosí et al. 2006) de la especie *Guadua angustifolia* pero no se han relacionado con características de calidad para los diferentes sectores de la cadena productiva, además, los resultados encontrados han sido contrastantes, indicando baja diversidad en los bancos de germoplasma y alta diversidad en poblaciones naturales.

La tala indiscriminada y explotación indebida de los guaduales ha generado una rápida pérdida de este recurso genético, además, la falta de estudios de diversidad genética en la especie plantea la necesidad de caracterizar morfológica y molecularmente poblaciones de *Guadua angustifolia* en el Valle del Cauca para el mantenimiento de la especie como recurso biológico, genético y con potencial de uso industrial. De esta manera, el programa “Mejoramiento de la productividad de *Guadua angustifolia* Kunth mediante la selección de materiales superiores y de la optimización del manejo silvicultural, para la obtención de materia prima de calidad: una contribución para el fortalecimiento de la competitividad de la cadena productiva con énfasis en el sector de la construcción”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y coordinado por la Universidad Nacional de Colombia (Muñoz y Londoño 2011), a través del proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero”, planteó la selección de materiales superiores y la evaluación de la diversidad genética, haciendo necesaria la realización de esta investigación como parte fundamental para el cumplimiento y desarrollo de estas actividades.

*Guadua angustifolia* sobresale dentro del género no solo por sus propiedades físico mecánicas sino por el tamaño de sus culmos (Sánchez et al. 2010). Ha sido seleccionada como una de las veinte mejores especies de bambúes del mundo, ya

que su capacidad para absorber energía y admitir una mayor flexión, la convierten en un material ideal para construcciones sismo-resistentes, sin embargo, en los últimos dos siglos, se redujo ostensiblemente la extensión de guaduales en el país, pasando de doce millones de hectáreas a solo cincuenta mil (Agudelo y Toro 1994).

La disminución de la población original de guadua en el Valle del Cauca se debe al avance de la agricultura de ladera, en especial a la consolidación del cultivo de la caña de azúcar a lo largo del valle del río Cauca y del café en zonas de ladera. Durante la colonización se utilizaron los guaduales como leña para hornos y como elemento maderero, haciendo vulnerables de desaparición a los guaduales naturales con el continuo crecimiento y expansión demográfica. La mayoría de las fincas ubicadas entre 100 y 1500 msnm., han perdido su selva nativa y solamente se observan los guaduales ubicados generalmente a orilla de quebradas y ríos, los cuales sirven como refugio de la fauna local. Estos guaduales son ecosistemas que albergan más de 120 especies de plantas, 48 especies de aves, 20 especies de mamíferos y siete especies de reptiles (Londoño 2004).

Únicamente, *Guadua angustifolia* ha tenido apropiación cultural, desarrollo tecnológico y una importancia económica local en el país. Sin embargo, los guaduales se han visto afectados en los últimos años por la tala indiscriminada y la destrucción de los bosques (Judziewicz et al. 1999), lo cual repercute directamente en la pérdida de recursos genéticos que aún permanecen desconocidos y que pueden ser de gran importancia en programas de manejo y mejoramiento de estas especies con valor comercial.

Por otro lado, conocer los patrones de distribución de la variación genética en recursos genéticos vegetales debe convertirse en objetivo primordial de las instituciones que realizan investigación. En estas especies, la variación se toma como el punto de partida para hacer mejoramiento genético por selección en características deseables no solo desde el punto de vista agronómico y nutricional sino también de la aceptación por los productores, para quienes estas especies tienen diferentes valores de uso (Stewart 1999).



Estudios internacionales sobre bambúes plantean la necesidad de conocer la diversidad genética del recurso, establecer las bases para la conservación y el uso sostenible a través de la investigación, además, desarrollar estrategias complementarias de conservación para el uso de estos recursos genéticos (Rao y Rao 2000).

## **Motivación y objetivos**

INCIVA, conjuntamente con la Universidad Santiago de Cali- USC, la Unidad Central del Valle del Cauca- UCEVA y la Fundación para el desarrollo social del centro del Valle del Cauca- FUNCEVALLE, en el año 2006 presentó, dentro de la estrategia de Bioregión, el proyecto “Banco de germoplasma de Bambusoideas del Jardín Botánico “Juan María Céspedes”, con la reintroducción de ecotipos caracterizados molecularmente, para la generación de investigación e innovación, que permitiera un mayor valor agregado para el desarrollo social y empresarial, bajo criterios de sostenibilidad. La propuesta buscó investigar y garantizar las variedades de Guadua y Bambúes que permitieran su utilización y transformación y con ello, generar nuevas actividades para fomentar el trabajo y el desarrollo social mediante el cuidado de los recursos naturales.

El proyecto se inició en el año 2007, adelantándose varias fases según el cronograma establecido y el compromiso de las instituciones participantes: recolección y enriquecimiento de las colecciones del Jardín Botánico del Valle y la granja El Bijal en el corregimiento de la Iberia- Tuluá, caracterización morfométrica y molecular, análisis de ADN y capacitación empresarial en el área Administrativa y de Formulación de Proyectos, cultivo de la guadua, artesanías y construcciones (Figura 1.1).

El material colectado se sembró en los bancos de germoplasma del Jardín Botánico y la granja El Bijal. Con esta colección se pretende estimular un crecimiento importante de los conocimientos sobre el alcance y la distribución de la diversidad genética dentro de los biotipos para el Valle del Cauca. Una vez establecida la colección, ésta se convirtió en un marco de referencia para otros estudios.

La caracterización molecular de cada uno de los ecotipos de guadua estudiados permitió caracterizar, estimar la diversidad y establecer la estructura poblacional de los rodales de guadua, y que en asociación con estudios de tipo ecológico y silviculturales, adelantados simultáneamente, hicieron posible realizar planes de manejo, fomento, uso y conservación más eficientes, de modo que se pueda mantener la diversidad localmente almacenada, en los miles de años de evolución de esta especie.

Para el logro de los objetivos propuestos el proyecto se dividió en los siguientes programas:

### **Programa 1. Recolección y siembra de material vegetal.**

Se realizaron varios recorridos por diferentes áreas del departamento y regiones vecinas con el propósito de recolectar material vegetal de guadua, que enriqueció la colección de Jardín Botánico “Juan María Céspedes” y sirvió de base para el establecimiento de la réplica de ésta en la granja El Bijal de la Iberia – Tuluá. Esto aseguró una reserva de clones de gran valor científico, ecológico, paisajístico y/o económico. La distribución de las especies en el terreno se hizo según su tamaño y tipo de reproducción natural.

En la recolección de material recolectado se tuvo en cuenta las características morfométrica de los individuos y del rodal. Entre los parámetros evaluados se cuentan: diámetro y altura del culmo, longitud del entrenudo, tamaño del tabique, tamaño aproximado del rodal, especies asociadas, altura sobre el nivel del mar, entre otros.

### **Programa 2. Evaluación de las colecciones vivas.**

Con base en las dos colecciones establecidas se realizaron investigaciones que aporten al conocimiento de este grupo y que permita la competitividad en el mercado. Inicialmente, se evaluó la adaptabilidad de las especies sembradas en la réplica de la colección viva de la Iberia. Los parámetros a medir son:

- Tiempo de rebrote de renuevos
- Crecimiento (Altura y diámetro)
- Número de renuevos por mata
- Análisis foliar.

### **Análisis de datos cuantitativos**

Mediante el uso del programa XLSTAT 2007, Versión 6 se desarrollaron las estadísticas simples y el Análisis Discriminante (AD) con el propósito de diferenciar los biotipos muestreados. Para esto último, se estimaron los datos perdidos con base en la media o la moda y no se incluyó a Cotuda por solo haber muestreado un individuo. Se supuso que las matrices de covarianza intraclase son iguales y las probabilidades a priori fueron tomadas en cuenta un nivel de significación del 5%.

### **Programa 3. Caracterización molecular**

Igualmente, con base en las colecciones anteriores, se caracterizó molecularmente las especies del género *Guadua* con un marcador codominante (STR). Este marcador codominante es altamente reproducible y permite la evaluación de un número alto de polimorfismos por reacción respecto a otros marcadores como RFLP's o AFLP's y RAPD's. Esto permitió caracterizar molecularmente los ecotipos, estimar la diversidad genética, establecer la estructura poblacional de los rodales de guadua, que en asociación con estudios de tipo ecológico y silviculturales, adelantados simultáneamente, hicieron posible realizar planes de manejo, fomento, uso y conservación más eficientes, de modo que se pueda mantener la diversidad localmente almacenada, en los miles de años de evolución de esta especie. Este conocimiento ha servido de apoyo a comunidades e instituciones interesadas en generar estrategias efectivas de reforestación, recuperación, comercialización y manejo sostenible de la especie.

### **Programa 4. Capacitación y educación.**

La guadua presenta oportunidades para múltiples aplicaciones, algunas de ellas con características de negocios en proceso de consolidación como el de la construcción

y estructuras; el de las artesanías y el más reciente, el de la guadua laminada. Una de las mayores necesidades de la región es la capacitación en estos temas para lograr hacer competitivo este importante región de la economía local a nivel nacional e internacional. Para ello, se programaron capacitaciones en las siguientes áreas:

- Cultivo de la guadua.
- Reconocimiento molecular de los ecotipos de valor ecológico, comercial y promisorio.
- Corte y aprovechamiento de la guadua.
- Diseños de productos artesanales, accesorios y muebles.
- Construcción de vivienda con guadua

Igualmente, con el propósito de unificar criterios, se realizará una capacitación interna dirigidas al personal involucrados en el proyecto.

#### **Programa 5. Desarrollo organizacional y empresarial.**

Es importante el fortalecimiento de grupo de artesanos y constructores de muebles que existen en la región, esto se debe hacer a través de la conformación del grupo y del apoyo de las instituciones en la capacitación y la organización.

Con el propósito de elevar y extender la competitividad de la región, se plantea como estrategia promover el desarrollo de pequeñas industrias alrededor de la guadua, especialmente la construcción, artesanías y muebles, desarrollando la capacidad emprendedora, empresarial y de gestión administrativa de los empresarios de la región. Para el logro de los objetivos se tendrá el acompañamiento y asesoría de FUNCEVALLE, entidad reconocida en la región por el fortalecimiento y consolidación de empresas locales. Esta actividad se desarrollará a partir de:

- Fortalecimiento, acompañamiento y asesoría a organizaciones de productores y transformadores.
- Capacitación de las organizaciones en gestión empresarial rural (aspectos administrativos, contables, financieros, de mercadeo, calidad, entre otros).

Se hará divulgación de resultados a través de publicaciones científicas nacionales e internacionales y público en general. Como complemento a lo anterior se buscará la participación en un evento relacionado con la guadua, donde se socializará los resultados de la presente investigación. Además, se diseñará una cartilla divulgativa con los temas mencionados en esta propuesta.

## **1 Estructura de la Tesis doctoral - Antecedentes taxonómicos, citogenéticos, filogenéticos, distribución geográfica e importancia**

### **1.1 Antecedentes taxonómicos.**

#### **1.1.1. Aspectos morfológicos**

*G. angustifolia* posee rizomas paquimorfos (Figuras 1.2.1, 1.2A.1); compuestos esencialmente por dos partes: el cuello, porción estrecha entrenodal que no posee yemas y propiamente el rizoma donde las yemas están presentes en los nudos (Figura 1.2.2). En *G. angustifolia* el cuello del rizoma es elongado con geotropismo positivo, por lo que primero crece hacia abajo desde el verdadero rizoma formando estructuras que asemejan puntales (Figura 1.2A.2), antes de dar salida a otro rizoma fusiforme, protuberante y pequeño (Young y Judd 1992). Este sistema rizomatoso de crecimiento simpodial tiene tres componentes: el rizoma, las raíces y las raicillas adventicias, mientras que la yema apical termina originando un tallo aéreo. Las yemas laterales continúan el crecimiento del rizoma repitiendo el mismo sistema de ramificación (Figuras 1.2.3, 1.2A.3). Este patrón de crecimiento es muy agresivo lo que hace que los rodales de guadua sean muy densos (Giraldo y Sabogal 1999).

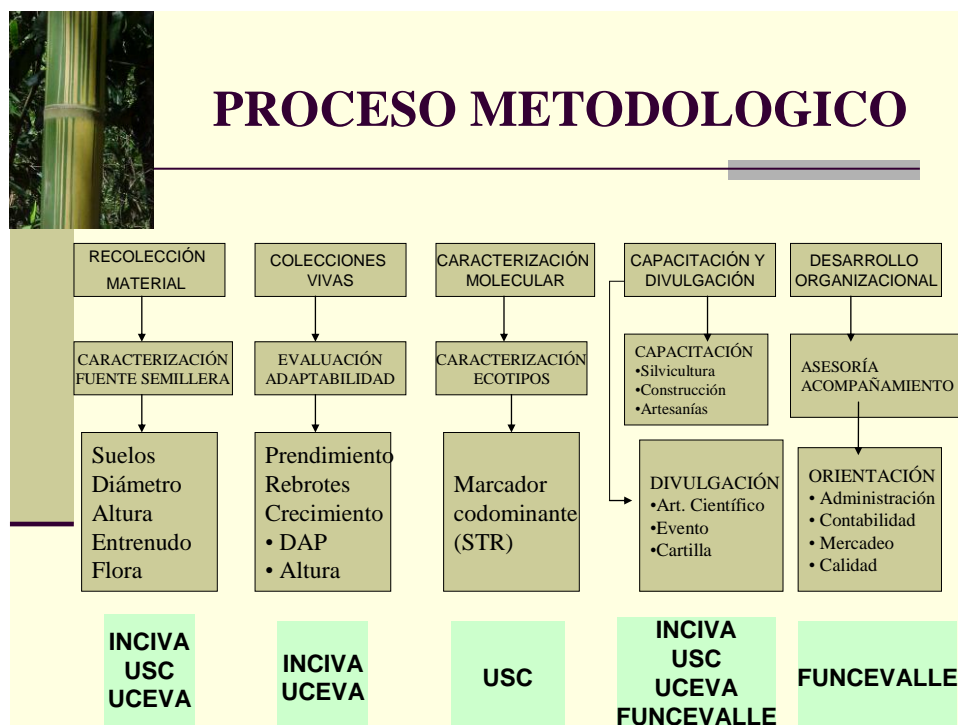


Figura 1.1. Proceso metodológico del proyecto dividido en fases según el cronograma establecido y el compromiso de las instituciones participantes.

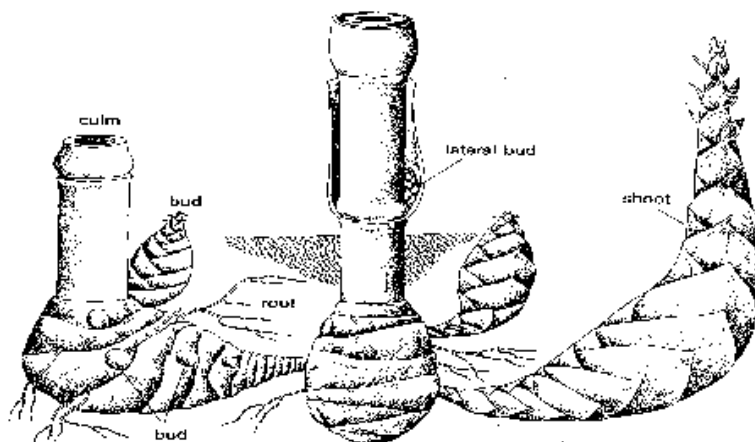


Figura. 1.2.1. Rizoma paquimorfo (Recht y Wetterwald 1988).

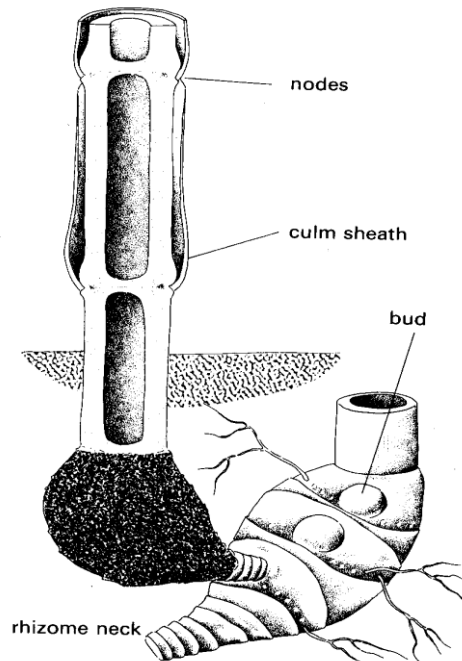


Figura 1.2A.1. Rizoma paquimorfo (Recht y Wetterwald 1988)

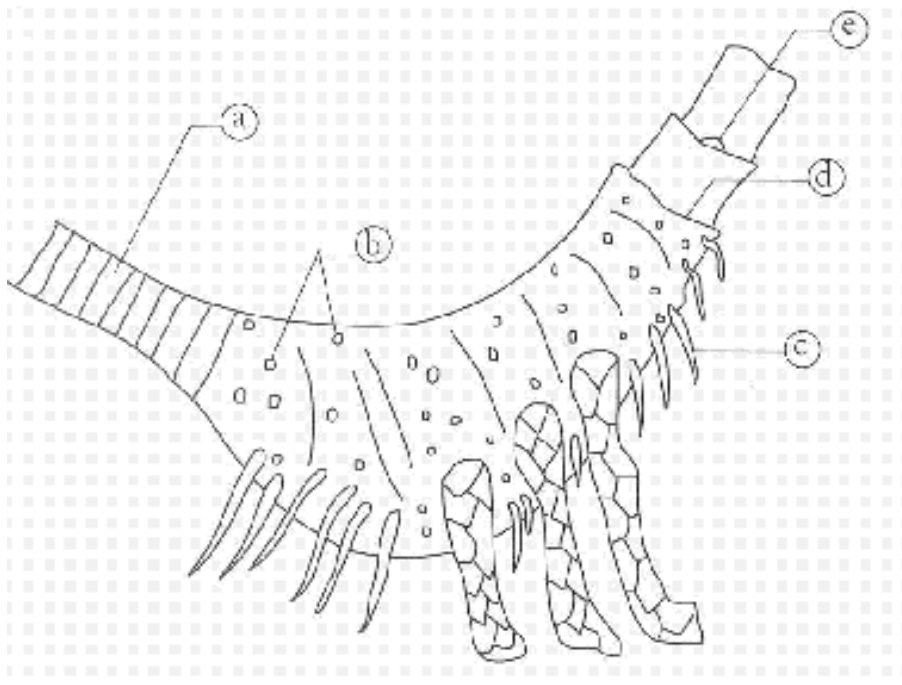


Figura 1.2.2. Pares del rizoma: a) cuello del rizoma; b) primordio de raices; c) raices adventicias; d) cuello; e) yema (Giraldo y Sabogal 1999).



Figura 1.2A.2. Cuellos del rizoma de *G. angustifolia* con elongación geotrópica positiva (Recht y Wetterwald 1988).

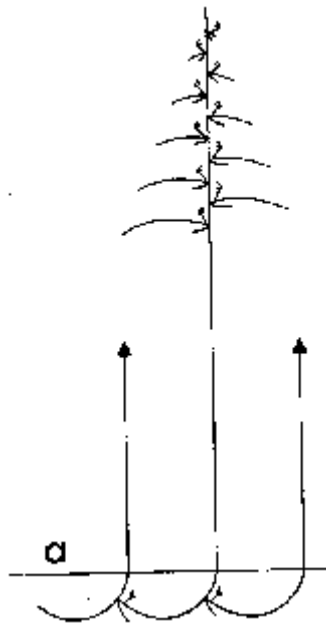


Figura 1.2.3. Sistema rizomatoso de crecimiento simpodial (Young y Judd 1992).



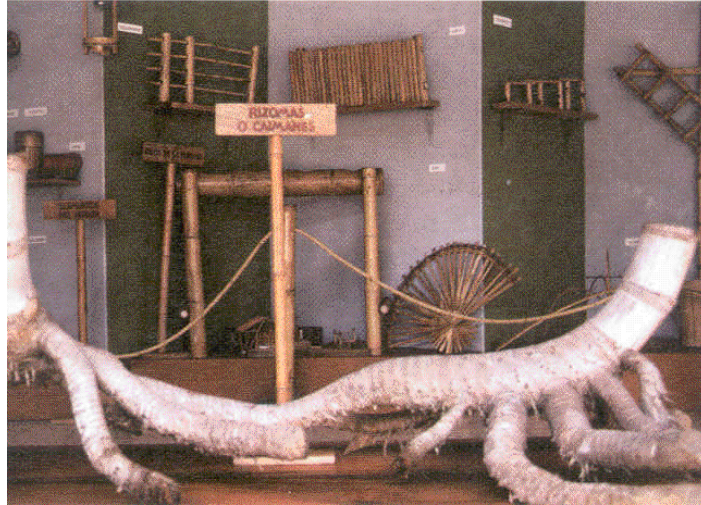


Figura 1.2A.3. Interconexión de rizomas de guadua (Giraldo y Sabogal 1999)

#### 1.1.1.1. Renuevos

Una vez formado el rizoma se inicia la fase de renuevo; el cual siempre emerge con un diámetro de tallo definido, debido a que no posee células de cambium o procambium que diferencien sus tejidos hacia fuera haciéndolo engrosar. Durante los primeros 30 días, alcanza entre 4 y 6 cm. de altura en 24 horas, el 60% de este crecimiento es durante la noche. Después de los 90 cm. de altura, el promedio de crecimiento oscila entre 9 y 11 cm. cada 24 horas. Está cubierto completamente por hojas caulinares (Figuras 1.2.4 y 1.2.5). De hecho el rebrote temprano se caracteriza por la ausencia de ramas basales y apicales, y por la presencia de hojas caulinares que cubren los nudos a lo largo de toda su extensión (2.6A.1 y 2.6A.2). En ésta fase la resistencia mecánica del tallo es mínima, (Giraldo y Sabogal 1999).



Figura 1.2.4. Renuevo o chusquín. Foto de D. Morales

El crecimiento longitudinal de los tallos se inicia con la elongación completa y sucesiva de los entrenudos, comenzando por el inferior y finalizando por el más apical; sólo se inicia la formación de un nuevo entrenudo cuando el inmediato anterior está definido. Desde que emerge del suelo hasta que alcanza su máxima altura tarda aproximadamente seis meses. Posteriormente el tallo monopodial detiene su crecimiento, comienza el desprendimiento de las hojas caulinares y las yemas nodales se activan dando paso a la formación de ramas basales y apicales.



Figura 1.2A1. Renuevo (Giraldo y Sabogal 1999).



Figura 1.2A2. Renuevo (Giraldo y Sabogal 1999).

#### 1.1.1.2. Culmo entrenodal y nodal

Los culmos entrenodales de *G. angustifolia* difieren de las otras especies de su género principalmente en el diámetro, largo y grosor de las paredes; los de esta especie tiene los diámetros más grandes y paredes de mediano grosor, con entrenudos basales que se caracterizan por ser los más cortos y de pared más delgada. El lumen está generalmente lleno de agua potable. El surco sobre el brote de la rama no se extiende generalmente más allá del entrenudo medio. Pelos deciduos cubren la superficie en una densidad variante desde usualmente esparcidos hasta completamente ausentes (Young y Judd 1992).

El nudo no difiere significativamente entre las especies de *Guadua*. El interior de la pared nodal puede ser convexa u horizontal y varía según el diámetro del culmo (Young y Judd 1992). Las partes de un culmo o tallo de *Guadua* se muestran en la Figura 1.2.5.

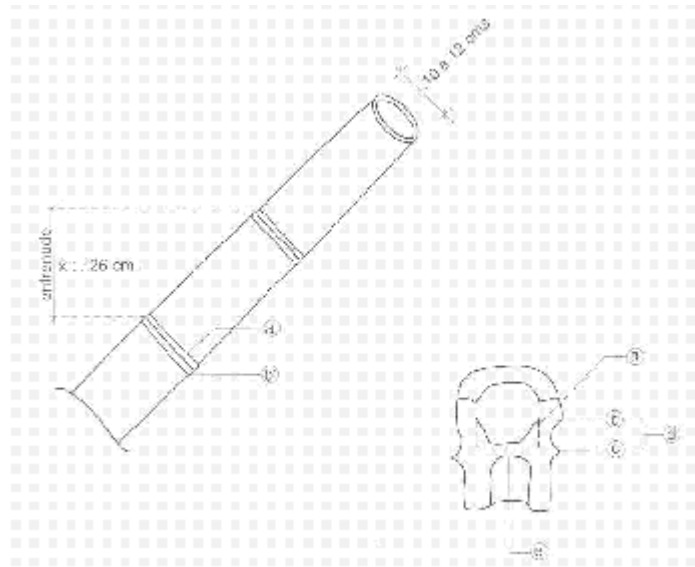


Figura 1.2.5. Partes del Tallo de Agua: a') banda nodal; b') nudo; a) cicatriz; b) parte superior del nudo; c) cicatriz de la vaina; d) entre nudo; e) diafragma (Giraldo y Sabogal 1999).

A través del tallo se destacan dos partes importantes: los nudos y los entrenudos. El primero es el área del tallo donde crecen ramas con hojas a partir de una yema nodal, en el interior del nudo se desarrolla un tabique transversal que interrumpe la cavidad denominada entrenudo. Los entrenudos cilíndricos tienen entre 10 y 12 centímetros de diámetro y paredes con grosores entre 2 y 5 centímetros, su textura es dura y consistente.

El crecimiento del culmo es ascendente o erecto, con dirección vertical y con alguna tendencia oblicua en su parte apical (Figura 1.2.6); en condiciones ambientales normales alcanza entre 18 a 20 metros de longitud promedio (Giraldo y Sabogal 1999).

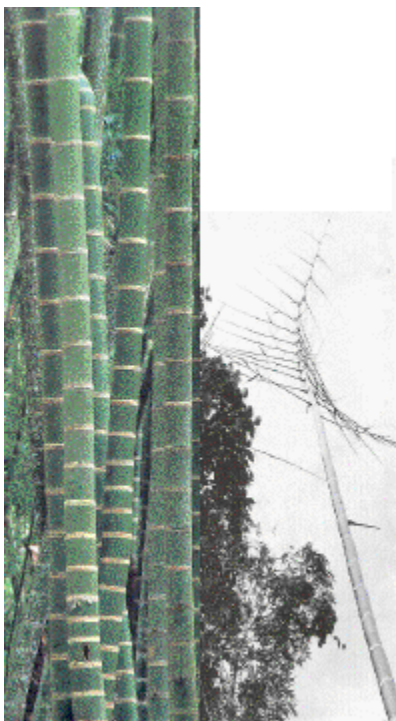


Figura 1.2.6. Crecimiento ascendente o erecto con dirección vertical de un culmo de *G. angustifolia subsp. angustifolia*, obsérvese la tendencia oblicua en su parte apical (Villegas 2003; Young y Judd 1992).

#### 1.1.1.3. Brácteas del culmo y ramas

Las brácteas son útiles para separar taxa; rodean y protegen los culmos de desarrollo reciente y son caducas (Young y Judd 1992). Las brácteas son hojas modificadas que se caracterizan por su fuerte consistencia coriácea, de forma triangular, y protegen las yemas. Se encuentran en el rizoma, en el tallo durante los primeros estadios del desarrollo y en las ramificaciones de la panta donde existen nudos con yemas. Su dimensión es variable según la edad y la parte de la planta donde se desarrollen; son deciduas en el extremo superior y se desprenden fácilmente desde la base (Giraldo y Sabogal 1999).

Las brácteas culmonares permanecen adheridas al nudo por su parte inferior y se desprenden una a una después de 45 días de emerger el renuevo o el rebrote; las brácteas de las ramas protegen las yemas axilares, se desprenden después de 15



días para dar paso a prefoliaciones o a las espigas nodales. Morfológicamente la bráctea está compuesta por la vaina (que es la parte amplia proximal que se adhiere al nudo) y por la lámina, ambas se conectan por medio de la lígula (ver Figura 1.2.7)

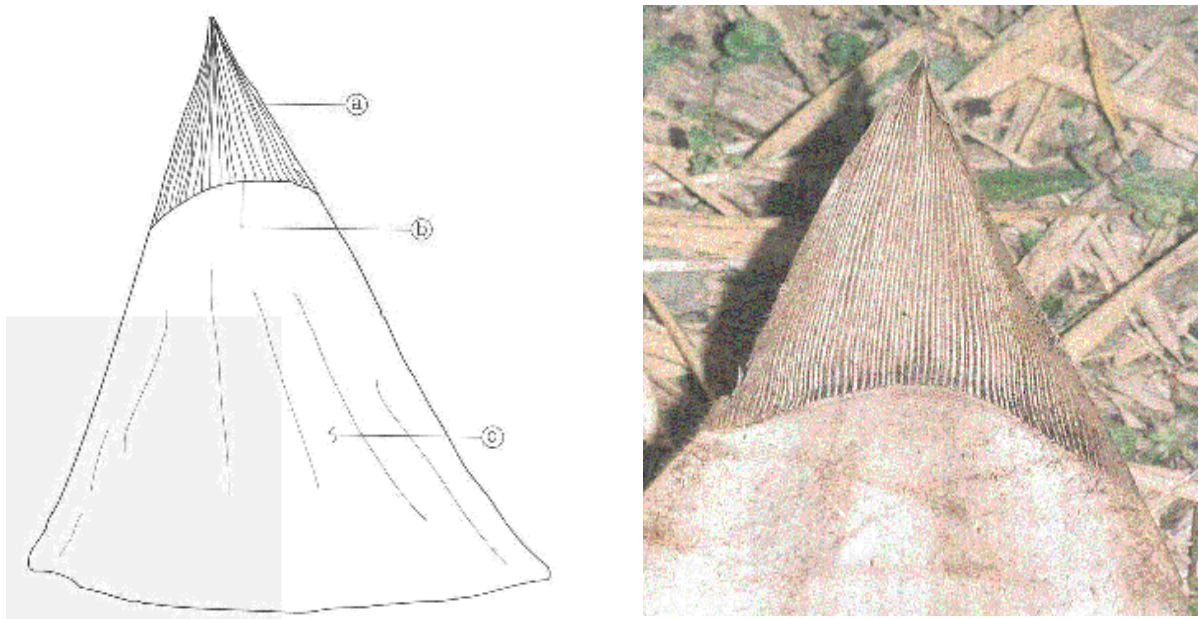


Figura 1.2.7. Partes de una bráctea del culmo de *G. angustifolia*: a) lámina; b) lígula; c) Vaina (Giraldo y Sabogal 1999).

#### 1.1.1.4. Lámina y vaina de la hoja

La lámina es simple, lanceolada con ápice acuminado, bordes finamente aserrados, con pubescencia simple, aislada y no persistente sobre el haz y el envés; tiene nervaduras longitudinalmente dispuestas paralelas a la nervadura central. La longitud promedio es de 15 a 20 centímetros y el ancho entre 2 a 5 centímetros. Dentro de una planta, a través del ciclo de vida su tamaño es muy variable (Young y Judd 1992). En el estado juvenil las hojas no son completamente lanceoladas y son más grandes, de color verde oscuro lustroso y se tornan verde pálido al final de su ciclo de vida. Una vez que la lámina se marchita es persistente, o sea no se cae (Giraldo y Sabogal 1999).

#### 1.1.1.5. Ramas

El patrón de ramificación no varía significativamente dentro de *G. angustifolia* (Young y Judd 1992), la disposición o filotaxis de las ramas a través del culmo es alterna (Giraldo y Sabogal 1999). La rama principal se desarrolla desde una yema individual en el nudo o yema nodal (Figura 1.2.8), el desarrollo de las ramas inferiores siempre varía. Los grupos de nudos cercanos a la base de las ramas contienen yemas inactivas o que pueden producir una o dos ramas secundarias, donde las ramas más bajas siempre producen espinas (Figura 1.2.9), mientras que las superiores podrían tenerlas o no. La rama principal puede producir una gran espina o puede emitir nuevas ramificaciones, y producir de una a cuatro espinas adicionales en la base (Young y Judd 1992).

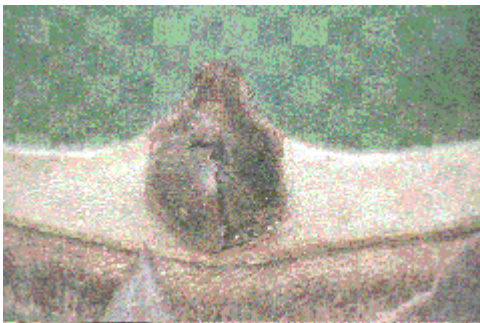


Figura 1.2.8. Yema nodal (Giraldo y Sabogal 1999).



Figura 1.2.9. Espinas de la rama (Giraldo y Sabogal 1999)

Por la posición de las ramas en el culmo y por la función que cumplen se han clasificado en ramas basales o bajas y ramas superiores (Figura 1.2.10) (Giraldo y Sabogal 1999).

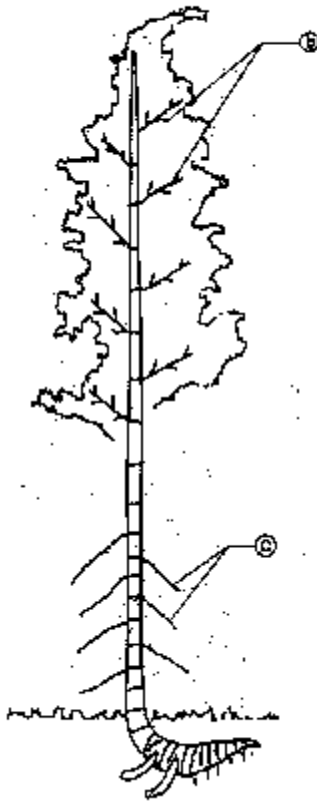


Figura 1.2.10. Posición de las ramas en el cuello: b) Superiores, y c) inferiores o bajas (Giraldo y Sabogal 1999).

Las ramas basales o bajas se encuentran en los primeros 8 ó 9 metros del tallo. Son producto de la activación de yemas de los nudos, de crecimiento plagiotrópico y solitario, con disposición alterna (figura 1.2.11). En el nudo de la rama se producen entre dos y cuatro espinas y una yema axilar que cuando se activa produce normalmente prefoliaciones con crecimiento ortotrópico, las espinas también se disponen alternamente (Giraldo y Sabogal 1999).





Figura 1.2.11. Ramas inferiores o basales, conocidas como riendas (Giraldo y Sabogal 1999).

Las ramas bajas tienen mucha variabilidad en cuanto al largo y diámetro. Normalmente alcanzan en promedio 3 a 3,5 metros de largo, hasta 8 m inclusive; los diámetros en su extremo proximal al culmo alcanzan hasta 2.5 cm, 2.0 cm en la parte media y en su extremo distal entre 1 y 1.5 centímetros.

Las ramas superiores se localizan a partir de los 12 m de altura, las yemas también se ubican de manera alterna, una vez activadas generan ramas con crecimiento casi ortotrópico; su longitud disminuye gradualmente con el incremento de la altura, las ramas superiores inferiores son las más largas con longitudes de hasta 3 m, las medias hasta 1,5 m, mientras que las apicales tienen un promedio de 0,25 m (Giraldo y Sabogal 1999).

#### **1.1.1.6. Hojas**

La prefoliación es involuta; filotáxicamente las hojas en las ramas son alternas, una en cada nudo, son persistentes tanto en las ramas superiores e inferiores (Giraldo y Sabogal 1999).

#### 1.1.1.7. Inflorescencia y flores

La siguiente descripción morfológica es de Soderstrom y Londoño 1988 (reproducido por Yong y Judd 1992). Del culmo principal se desarrolla un patrón monopodial alterno de ramas desde los nudos con cada rama sucesiva, haciéndose más pequeñas hasta que la secuencia se detiene en las ramitas más pequeñas. Cada rama está protegida por una hoja o bráctea e inicia con una hoja de doble quilla llamada prófalo. Cuando la floración ocurre las ramillas vegetativas se alargan a longitudes más allá de las hojas del follaje y terminan en una serie de uno a cuatro pequeños entrenudos vegetativos seguidos de una sola espiga: la florescencia principal. Ramas florales adicionales pueden también originarse a partir de yemas vegetativas más lejanas debajo de la rama (Figura 1.2.12, Young y Judd 1992).

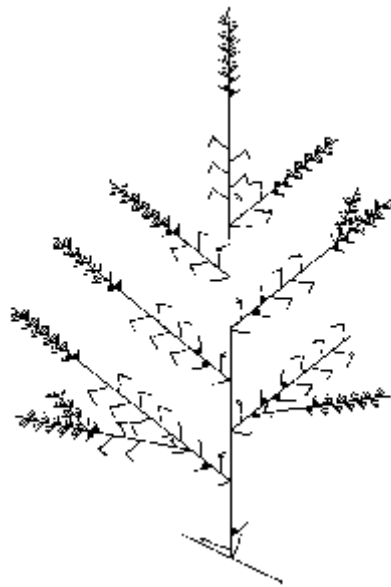


Figura 1.2.12. Inflorescencia de *G. angustifolia* Desarrollo de la inflorescencia (unión de inflorescencias) con una extensión de una ramita o desde una yema lateral; círculos vacíos = floretes fértiles; círculos rellenos = yemas vegetativas; banderola doble = prófalo; línea curvada con punta en garfio = vaina de la hoja de la rama y lámina, respectivamente; sólo línea curvada = brácteas; brácteas gemíparas, lema o gluma; línea contorsionada = partes del eje terminal abortado (Young y Judd 1992).

Los entrenudos cortos más abajo de estas ramas florales son vegetativos y contienen de una a varias yemas vegetativas. Estas yemas están protegidas por brácteas gemíparas. Los segmentos de ramas vegetativas producen las brácteas gemíparas y la misma espigilla, a ambas se les llama pseudoespigillas.

Cuando la floración se inicia las pseudoespigillas que se desarrollan en el ápice de las ramas tienen los mismos prófilos y brácteas protectoras, como las de las ramas de las cuales ellas se desarrollaron. Las pseudoespigillas que se desarrollan desde los nudos de las ramas inician con un prófilo y son protegidas por una bráctea en la base de la rama.

A medida que la floración continúa cada yema dentro de una bráctea gemípara puede convertirse en otro eje vegetativo acortado llamado paracladio, terminando en una espiguilla o coflorescencia. Esta secuencia puede proceder a formar una bola de pseudoespigillas, pero en *G. angustifolia* usualmente sólo dos o tres ramas recortadas se desarrollan juntas para formar una sinflorescencia o bien las yemas pueden no desarrollarse del todo. Las pseudoespigillas que dan surgimiento a ésta sinflorescencia llamada la florescencia principal (Figura 1.2.13).

El eje corto entre la porción vegetativa de la rama y la porción floral (podría llamarse pedúnculo) no ramifica antes de que se convierta en parte de la espigilla. Los floretes más bajos se desarrollan primero y los que se forman posteriormente llegan a ser gradualmente más pequeños hacia el ápice como en una típica inflorescencia racemosa. En la figura 1.2.14.A se detallan gráficamente los componentes de la flor.

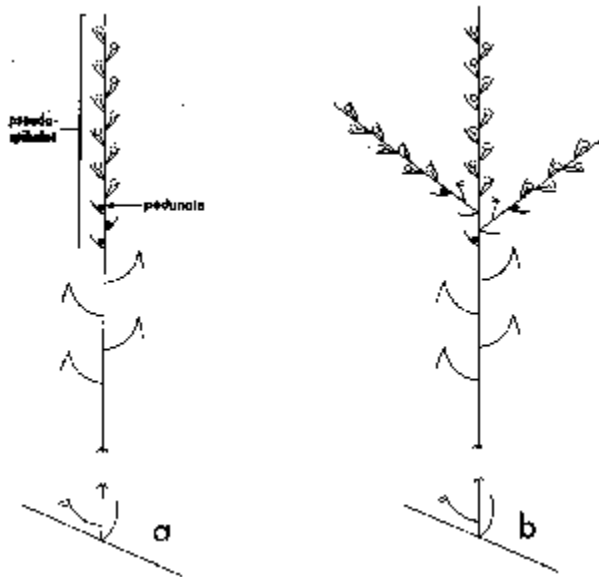


Figura 1.2.13. Pseudoespigilla de *G. angustifolia*). a. florescencia principal; b. ramificación de yemas vegetativas de la florescencia principal para formar una sinflorescencia, constituida por una florescencia principal y dos coflorescencias. Círculos vacíos = floretes fértiles; círculos rellenos = yemas vegetativas; banderola doble = prófalo; línea curvada con punta en garfio = vaina de la hoja de la rama y lámina; respectivamente, solo línea curvada = brácteas; brácteas gemíparas; lema o gluma; línea contorsionada = parte del eje terminal abortado (Young y Judd 1992).

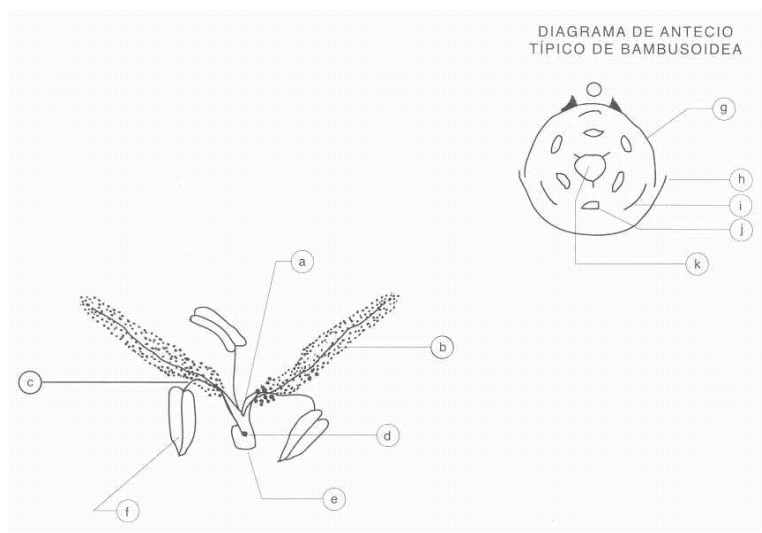


Figura 1.2.14A. Componentes de la flor. a) Estilo; b) estigma; c) filamento; d) ovario; e) lodícula; f) antera (Giraldo y Sabogal 1999).

### 1.1.2. Aspectos Anatómicos

La siguiente introducción general a la anatomía del culmo fue tomada de Liese (1993). Las propiedades de la caña están determinadas por su estructura anatómica. La caña consta de nudos y entrenudos (Figura 1.2.15); en los entrenudos las células están orientadas axialmente mientras los nudos proveen las interconexiones transversales. Dentro de los nudos hay una intensa ramificación de los vasos y del floema; estos se curvan radialmente hacia el interior y proveen la conducción transversal a través de los diafragmas nodales, de tal modo que todas las partes de la caña aparecen entrelazadas.

La parte externa de la caña está formada por dos capas celulares epidermales, siendo la interna más gruesa y altamente lignificada, mientras que las más externas están cubiertas por una capa cutinizada que posee una cobertura de cera por encima. Las partes internas de la caña constan de numerosas células de esclerénquima, lo que impide el movimiento lateral de líquidos. Los pasajes para la penetración son principalmente las uniones de la caña.

La estructura anatómica general de una sección transversal de cualquier entrenudo de caña está determinado por la forma, tamaño, arreglo y número de haces vasculares. En la zona periférica de la caña las haces vasculares son más pequeños y numerosos, en las partes internas son más grandes y escaso (Figura 1.2.16).



Figura 1.2.15. Sección transversal de la pared del culmo de *G. angustifolia*. Micrografía óptica de transmisión y fluorescencia. Fotos de Gritsch et al. 2004.

El tejido de una caña consta de células de parénquima y de haces vasculares los cuales están compuestos por vasos, tubos cribosos y células acompañantes y

fibras. La totalidad de la caña comprende aproximadamente 50% de parénquima, 40% de fibra, y 10% de tejidos conductivos (vasos y tubos cribosos) con algunas variaciones según la especie. Los tejidos de la caña muestran un patrón definido de distribución tanto horizontal como vertical; el parénquima y el tejido conductivo es más frecuente en el tercio interno de la pared, mientras que en el tercio exterior el porcentaje de fibras es significativamente mayor. En dirección vertical la cantidad de fibras aumenta desde la base hacia la punta, mientras que el parénquima disminuye. No utilizar la parte alta de la caña representaría un desperdicio con respecto a su alto contenido de fibra. En la tabla 1.1. se presenta el porcentaje de diferentes tejidos en el culmo de *G. angustifolia* según Londoño et al. (2002).

Tabla 1.1. Porcentaje de diferentes tejidos en el culmo de *G. angustifolia* a la edad de 48 meses (Londoño et al. 2002).

Tejido	Segmento			Total
	Basal (%)	Medio (%)	Apical (%)	
Parénquima	63	64	36	51
Fibras	29	26	56	40
Conductivo	8	10	8	9

Los valores de la tabla.1.1 comparados con los valores generales presentados por Liese (1993) para bambúes tropicales y subtropicales indican que *G. angustifolia* exhibe una proporción típica de fibras. La siguiente descripción de tejidos fue tomada de Londoño et al. (2002).

### 1.1.2.1. Esclerenquima y parénquima

En esta figura 2.17 se indica:

- a) Corte transversal del culmo (4 años) mostrando el ordenamiento de los haces vasculares tipo lib.
- b) Sección aumentada de un haz mostrando la gran cantidad de tejido esclerenquimático y parenquimático que lo rodea.
- c) Haz vascular mostrando los vasos de protoxilema, una sección de floema y tejidos esclerenquimáticos y parenquimáticos.
- d) Se observa la lucina del protoxilema con dos anillos individuales de soporte.
- e) Puntuaciones pared del parénquima.
- f) Corte longitudinal mostrando fibras y tejido parenquimático.

La sección longitudinal de *G. angustifolia* muestra células largas y cortas de parénquima (Figuras 1.2.16 y 1.2.17f). En una sección transversal se puede observar el esclerenquima y parénquima rodeando los haces vasculares (Figura 1.2.17 b, c). Las células cortas y largas del parénquima se lignificarán en edades tempranas durante el crecimiento del rebrote. Las células largas usualmente tienen paredes más delgadas, mientras que las cortas son pequeñas y de forma cúbica; se caracterizan por un citoplasma más denso y las paredes finas debido a que no han lignificado con la edad como las células largas.

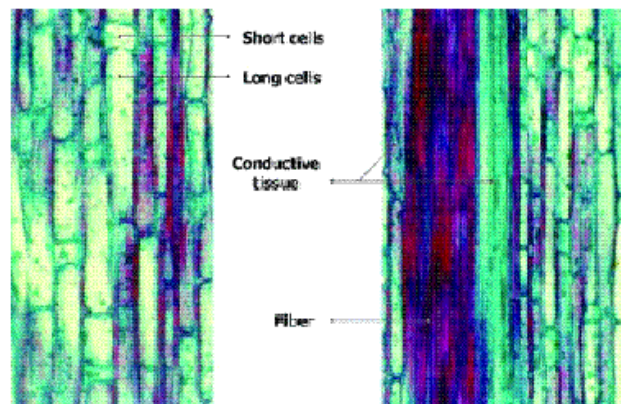
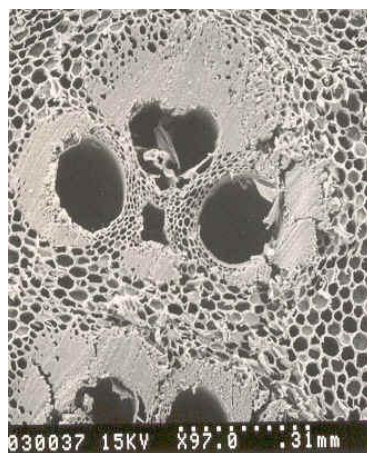


Figura 1.2.16. Sección longitudinal del culmo de *G. angustifolia*. La microfotografía muestra el parénquima compuesto por células cortas y largas, y fibras de esclerenquima (Londoño 2002).

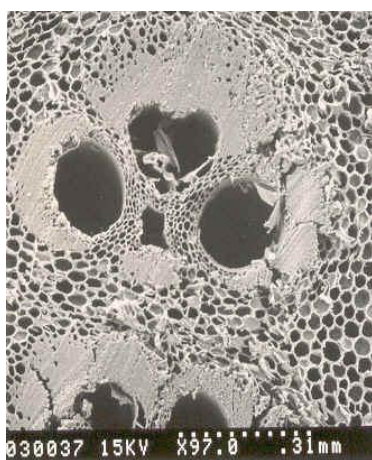




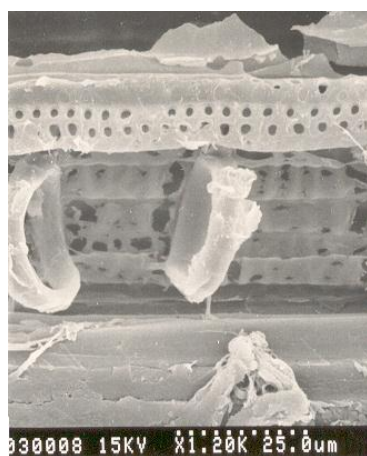
a)



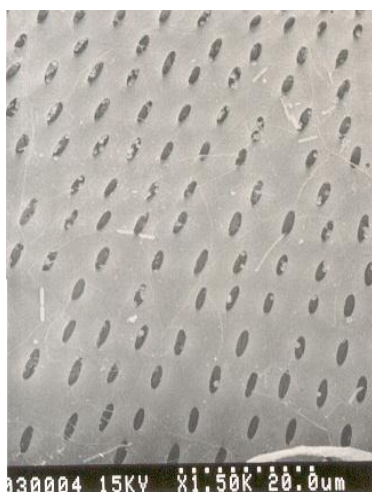
b)



c)



d)



d)



e)

Figura 1.2.17. Sección transversal del culmo de *Guadua angustifolia*. Micrografía Electrónica de Barrido (Montiel 2004).



### 1.1.2.2. Bandas vasculares

Las bandas vasculares o estructuras conductivas están constituidas por tejido xilemático (transporte de agua) y floemático (transporte de fotosintatos). Estos son los haces vasculares y tubos cribosos, respectivamente. Un haz vascular de *G. angustifolia* está formado por dos vasos de metaxilema, uno o dos elementos de protoxilema, el floema, la vaina de esclerénquima y las fibras (Figura 1.2.18); según la clasificación de haces vasculares de Grosser (1971), Grosser y Liese (1971, 1973) y Sekar y Balasubramanian (1994) todos mencionados por Londoño (2002), *G. angustifolia* exhibe haces vasculares tipo II y IIa dependiendo de su localización a través de la pared del culmo (Figura 1.2.18, ver también la Figura 1.2.23). La Figura 1.2.17a muestra los haces tipo IIb en *G. angustifolia* según Montiel (2004).

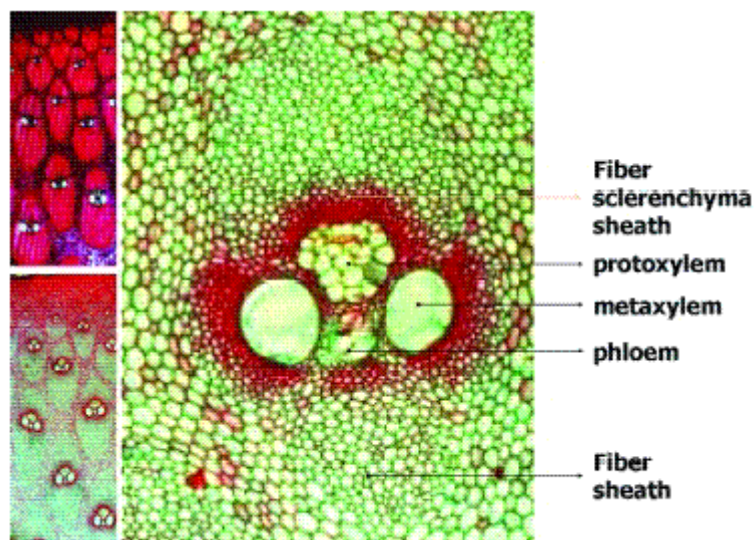


Figura 1.2.18. Sección transversal de un culmo de *G. angustifolia*. La micrografía óptica muestra un haz vascular (Londoño 2002).

El metaxilema está formado por dos vasos separados por tejido parenquimático con un espacio intercelular entre ellos (Figura 1.2.18). Células con parénquima lignificado rodean los vasos del metaxilema, sin embargo el parénquima que rodea el espacio intercelular siempre permanece no lignificado. Los vasos periféricos del metaxilema son pequeños e incrementan su tamaño en el medio y en las secciones internas; es un comportamiento constante durante la maduración del culmo.

También hay variación longitudinal dentro de los entrenudos, los vasos son más largos en el segmento medio del culmo que en los segmentos basal y apical. El tamaño y el área de los vasos del metaxilema son críticos para la conductividad del agua en bambú, e importantes para la preservación de culmos frescos cuando se usa el método Boucherie para la preservación de la madera. El floema está formado por tubos cribosos largos de pared delgada no lignificados y siempre conectados a las células acompañantes. Los poros cribosos se alinean con pequeñas plaquetas callosas conectadas a los tubos cribosos. En *G. angustifolia* el floema está formado por 14 a 25 tubos cribosos.

#### **1.1.2.3. Fibras**

Las fibras se caracterizan por su forma delgada, larga y afilada en ambos extremos y algunas veces son bifurcadas. Su largo tiene influencia sobre la fortaleza del culmo y sus propiedades para pulpa. Vainas de fibra esclerenquimática rodean los haces vasculares (floema y xilema) (Figura 1.2.18); ellas difieren en tamaño, forma y localización, dependiendo de la especie, edad y de su localización en el culmo (Figuras 1.2.19 y 1.2.20).

Un haz vascular central está rodeado por cuatro vainas esclerenquimáticas, dos a cada lado de los vasos del metaxilema, otro alrededor del protoxilema (espacio intracelular), y otro alrededor del floema. Las vainas de esclerénquima del floema son más prominentes en la zona media e interna del haz, esto es de valor para la clasificación anatómica. En los haces vasculares de la periferia y las zonas de transición, la vaina de esclerénquima es más prominente hacia el protoxilema (Figura 1.2.19).

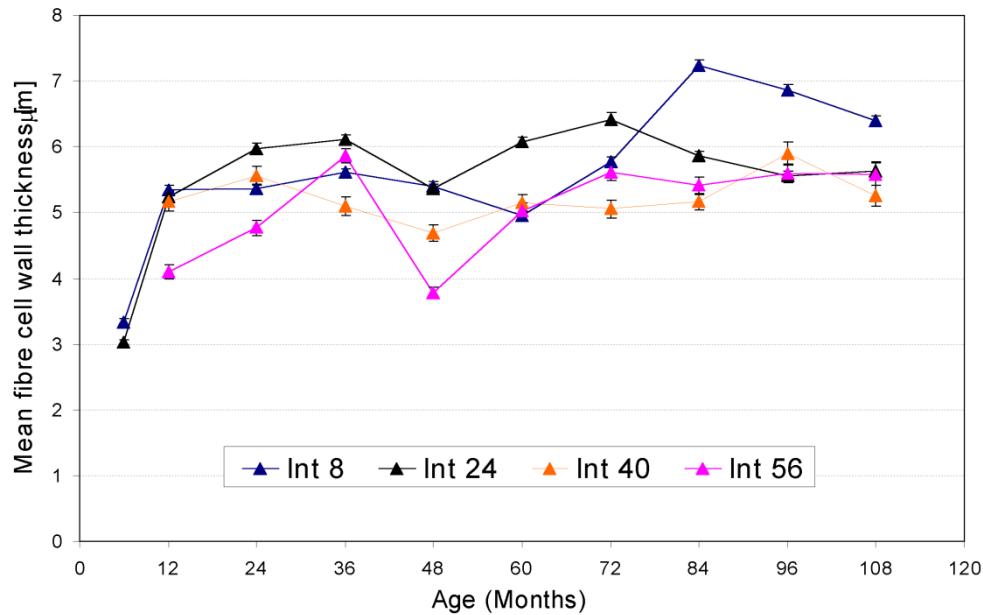


Figura 1.2.19. Variación en el engrosamiento de la pared celular de la fibra de acuerdo a la posición en el culmo y a la edad. Jardín Botánico Universidad tecnológica de Pereira, Risaralda – Colombia. Culmos de Rizoma viejo. Cada punto es el promedio de 300 observaciones, barras: error estándar (Gritsch y Murphy 2004).

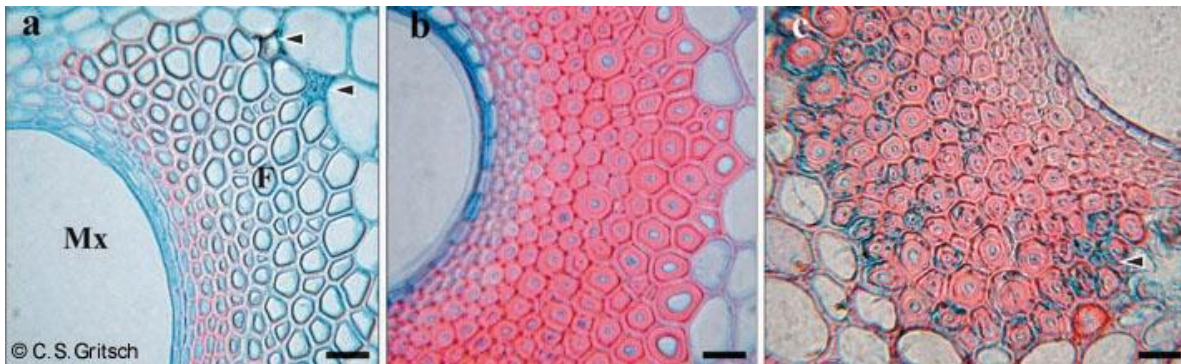
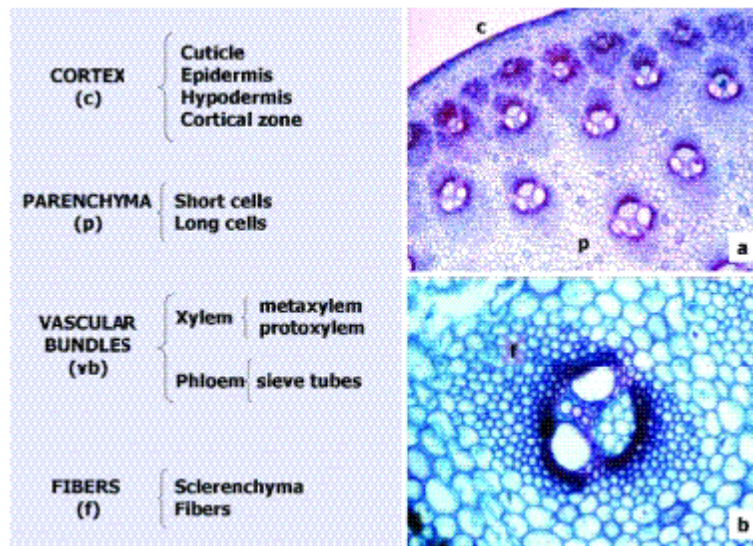


Figura 1.2.20. Engrosamiento de la pared celular de las fibras en relación con la edad: a) Fibras de pared delgada (F) en culmos menores de 6 meses; las flechas indican cuerpos de silicio; b) paredes celulares engrosadas en culmos de tres años, c) culmos mayores a 8 años, con signos de degradación por hongos (tinción azul indicado con flecha). Micrografía óptica de transmisión y fluorescencia. Fotos de (Gritsch y Murphy 2004).

#### 1.1.2.4. Grosor de la pared del culmo

Las características anatómicas del grosor del culmo (dimensiones de los haces vasculares, diámetro del metaxilema, porcentaje de parénquima, fibra y tejidos vasculares), no tienen correlación con la edad del culmo, mientras que el porcentaje de tipos celulares es similar a otros bambúes (Gritsch y Murphy 2004; Londoño et al. 2002). La Figura 1.2.21 muestra micrografías de la sección transversal del culmo y su estructura anatómica (Figura 1.2.12).



Figuras 1.2.21. Estructura anatómica del culmo de *G. angustifolia*. Arriba, a) Sección transversal, b) detalle de un haz vascular. Abajo, a) corteza, b) detalle de un estoma, c) detalle de la célula silíceo. Microscopía óptica (Londoño et al. 2002).

En *G. angustifolia* el grosor de la pared del culmo decrece más rápido en el segmento basal, lo cual podría explicar por qué los cambios anatómicos entre un entrenudo y el siguiente son más pronunciados en este segmento que en los segmentos medio y apical. En la Figura 1.2.22 se describe el patrón de variación del grosor de la pared del culmo (visto desde la sección transversal) de varios entrenudos en diferentes posiciones del culmo.

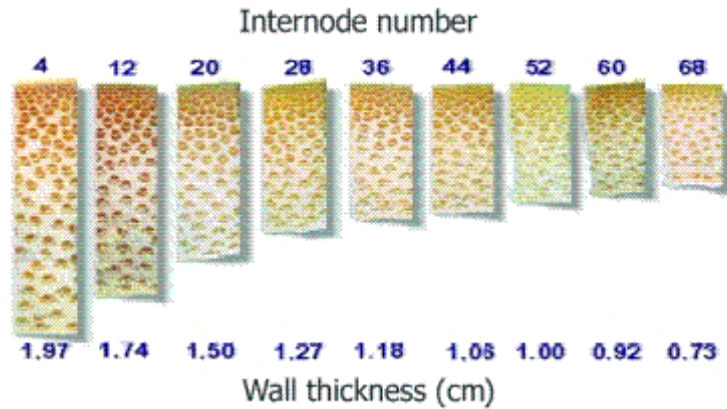


Figura 1.2.22. Sección transversal del culmo; se muestra la variación en el grosor de la pared (Wall thickness) del culmo durante 48 meses sobre un único culmo en 68 entrenudos (Londoño et al. 2002).

En las tablas siguientes (según Londoño et al. 2002) se presentan las características anatómicas de los haces vasculares de acuerdo a la edad y la zona de engrosamiento de la pared (tabla 1.2), la variación en el engrosamiento de la pared entrenodal con la edad del culmo (tabla 1.3), la variación en el engrosamiento de la pared entrenodal, diámetro y longitud de entrenudo a lo largo de 48 meses de edad del culmo (tabla 1.4), y las características anatómicas del haz vascular a lo largo del culmo y a través del engrosamiento de la pared (tabla.1.5).

Tabla.1.2. Características anatómicas de los haces vasculares de acuerdo a la edad y a las zonas de engrosamiento de la pared del culmo (Londoño et al. 2002).

Edad (meses)	Zona periférica				Zona de transición			Zona media				Zona interna			
	DVB (n/cm <sup>2</sup> )	R/T	Diám.mx (mm)	Fibra (%)	R/T	Diám.mx (mm)	Fibra (%)	DVB (n/cm <sup>2</sup> )	R/T	Diám.mx (mm)	Fibra (%)	DVB (n/cm <sup>2</sup> )	R/T	Diám.mx (mm)	Fibra (%)
6	476,0	1,57	0,02	95,47	1,93	0,06	92,58	81,6	1,49	0,11	85,09	53,9	0,67	0,20	64,81
12	346,0	1,23	0,03	96,71	2,05	0,05	90,15	142,8	1,63	0,16	84,09	58,8	0,67	0,22	66,18
18	367,2	1,15	0,02	95,99	2,67	0,10	90,29	136	1,61	0,17	82,3	52,3	0,79	0,20	67,03
24	387,6	1,2	0,02	97,20	1,77	0,07	95,71	132,6	1,7	0,15	86,55	58,8	0,93	0,21	86,67
30	408,0	1,33	0,02	97,00	1,56	0,07	96,51	183,6	1,73	0,13	89,23	65,4	0,82	0,20	69,41
42	408,0	1,28	0,02	96,50	1,55	0,10	94,65	163,2	1,54	0,16	84,67	56,6	0,87	0,22	66,97
48	448,8	1,43	0,02	94,53	1,70	0,09	89,98	183,6	0,98	0,15	66,28	65,4	0,64	0,21	66,89
54	489,6	1,35	0,02	94,14	1,71	0,09	92,33	193,8	1,16	0,16	78,6	71,9	0,62	0,21	67,33
60	530,4	1,30	0,02	94,10	1,74	0,03	93,39	176,8	1,5	0,15	87,26	65,4	0,65	0,20	64,93
84	489,6	1,18	0,02	95,46	1,68	0,08	92,90	163,2	1,41	0,16	85,77	65,4	0,94	0,19	68,52
108	448,8	1,28	0,02	95,26	1,52	0,07	92,55	163,2	1,51	0,16	86,91	69,7	0,77	0,20	66,92
120	448,8	1,25	0,02	95,16	1,66	0,06	91,14	190,4	1,41	0,12	85,09	95,8	0,75	0,20	68,75
Promedio	435,2	1,20	0,02	95,63	1,77	0,07	92,94	159,5	1,48	0,15	83,96	64,0	0,70	0,20	68,7

Tabla 1.3. Variación del engrosamiento de la pared entrenodal con la edad del culmo (Londoño et al. 2002).

Edad (meses)	Tejido total (mm)	(%)			
		PZ	TZ	MZ	IZ
6	17,33	3,72	8,05	80,21	7,47
12	19,47	3,42	6,67	82,74	7,01
18	18,20	4,03	6,78	78,39	10,81
24	17,00	4,24	9,61	75,18	10,98
30	16,00	4,38	9,06	76,88	9,69
36	18,80	3,83	7,18	79,41	9,57
42	20,00	3,47	7,67	81,70	7,17
48	16,00	4,38	8,75	78,13	8,75
54	13,00	5,13	12,05	69,23	13,59
60	12,00	6,00	12,78	67,61	13,61
72	19,00	3,68	7,89	77,89	10,53
108	14,00	5,50	18,21	63,79	12,50
120	10,00	7,00	24,50	49,50	19,00
Promedio	16,22	4,52	10,71	73,90	10,82
PZ = zona periférica; TZ = zona de transición; MZ = zona media; IZ = zona interna					

Tabla 1.4. Variación en el engrosamiento de la pared del entrenudo, diámetro y largo del entrenudo a lo largo de 48 meses en un culmo viejo (Londoño et al. 2002).

Segmento del culmo	Zona de engrosamiento			Diámetro (cm)	Largo del entrenudo (cm)	Engrosamiento de pared (cm)
	PZ	MZ	IZ			
Basal	2,2	14,5	2,0	11,15	20,25	1,82
Medio	2,0	8,9	2,3	11,05	34,83	1,32
Apical	1,6	4,3	2,1	5,84	33,38	0,89
PZ = zona periférica; MZ = zona media; IZ = zona interna						

Tabla.1.5. Características anatómicas del haz vascular a lo largo del culmo, y a través del engrosamiento de la pared (Londoño et al. 2002).

Variables	Segmento del culmo											
	Zona basal				Zona media				Zona apical			
	promedio	PZ	MZ	IZ	promedio	PZ	MZ	IZ	promedio	PZ	MZ	IZ
DVB n/cm <sup>2</sup> )	169	377	68	61	184	392	82	77	350	612	224	215
R/T	1,05	1,41	0,91	0,82	0,95	1,4	0,92	0,52	0,91	1,33	0,85	0,56
Diámetro mx (mm)	0,14	0,03	0,19	0,22	0,16	0,03	0,2	0,26	0,11	0,03	0,13	0,16
Fibra (%)	29	64,51	23,1	22,7	26	59,38	19,34	19,68	56	63,36	71,71	21,9
PZ = zona periférica; MZ = zona media; IZ = zona interna												

#### 1.1.2.5. Aspectos taxonómicos

El bambú es una planta gramínea, botánicamente se clasifica en los Cormofitos, dentro de la subdivisión de los espermatofitinos (Fanerógamas):

Clase: Angiospermas Familia: Gramineae Poaceae

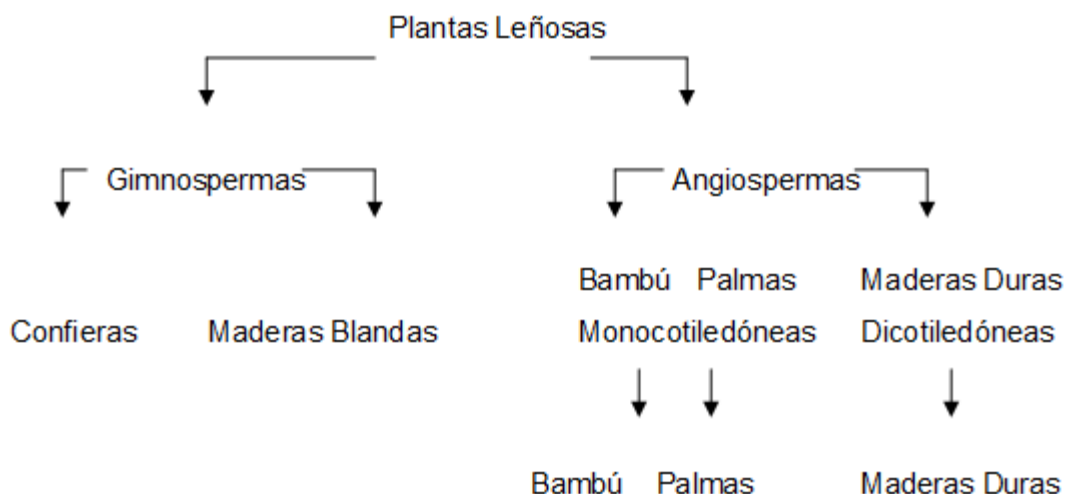
Subclase: Monocotiledóneas Subfamilia: Bambusoideae

Orden: Glumiflorales Tribu: Bambusae o Poaceae

Dentro de la subfamilia Bambusoideae existen aproximadamente 90 géneros en los que se clasifican las 1250 especies que se conocen dentro de seis (6) tribus: Anomochloaeae, Olyreae, Buerge, Siochioeae, Sreptochactaeae y Bambusae.

La especie bambusea es la más utilizada en la Industria de la construcción, dentro de la que se encuentra la *Guadua angustifolia* como la especie de mayor aplicación en Colombia. Las Gramíneas Bambusoides, morfológicamente se encuentran en el grupo de las plantas leñosas que se clasifican así:



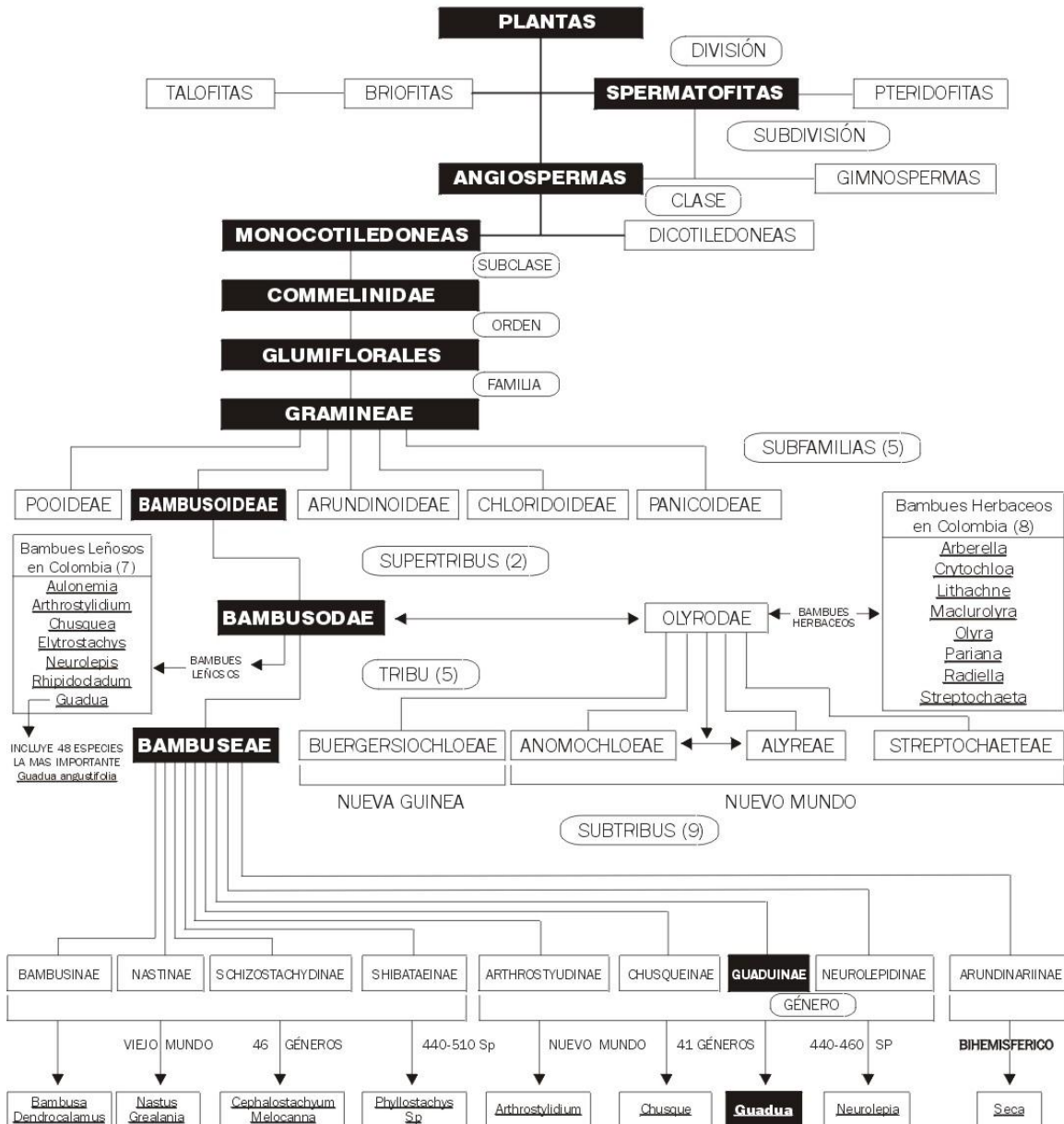


La guadua es el bambú americano de más amplia distribución; es una gramínea (familia Poaceae), más específicamente de la subfamilia Bambusoideae, tribu Bambuseae, subtribu *Guaduinae* y género *Guadua* (Figura 1.2.23, Londoño 1998).

El género *Guadua* Kunth contiene aproximadamente 30 especies. Varían ampliamente desde plantas delgadas y espinosas con culmos trepadores a espinosas con culmos erectos (Young y Judd 1992; Londoño 1998). *G. angustifolia* fue descubierta por Humboldt y Bonpland en 1806. *G. angustifolia* constituye un complejo que incluye *G. angustifolia* y dos parientes cercanos *G. aculeata* y *Bambusa chacoensis*, generalmente confundida o identificada como *G. angustifolia*. Young y Judd (1992) las consideran subespecies (subsp. *angustifolia* y *chacoensis*, respectivamente); *G. angustifolia* tiene tres variedades (Judziewicz et al. 1999) o razas geográficas según Young y Judd (1992): *G. angustifolia* var. *angustifolia*, *G. angustifolia* var. *bicolor* Londoño, y *G. angustifolia* var. *nigra* Londoño.

A pesar de las confusiones que han producido las descripciones y colecciones inadecuadas, el complejo *G. angustifolia* tiene características que lo separan claramente de las otras especies de *Guadua* (Young y Judd 1992); hay 24 descritas y otras muchas aún no catalogadas (Judziewicz et al. 1999). La siguiente clasificación filogenética incluye 29 especies, se anota también su distribución (Londoño 1998.; Judziewicz et al. 1999, ver también tabla 1.6):

## TAXONOMÍA DE LA GUADUA



FUENTE: XIMENA LONDOÑO I.A.

Figura 1.2.23. Taxonomía del género *Guadua* (Londoño 1998).

Tabla 1.6. Especies del género *Guadua*, especialmente de culmos erectos, se anota también su distribución.

Género <i>Guadua</i> (Kunth):	Especies del grupo de culmos erectos, Londoño 1998.
<i>G. aculeata</i> E. Fournier:	Distribuida de México a Nicaragua.
<i>G. amplexifolia</i> J.S.Presl:	Distribuida desde el sur de México al norte de Colombia y Venezuela.
<i>G. angustifolia</i> Kunth:	Nativa de Venezuela, Colombia y Ecuador; ampliamente introducida en países andinos y centroamericanos.
<i>G. angustifolia</i> var. <i>Angustifolia</i> :	Extendida a través del rango de la especie
<i>G. angustifolia</i> var. <i>Bicolor</i> Londoño:	Ubicada en el centro de Colombia.
<i>G. angustifolia</i> var. <i>Nigra</i> Londoño:	Ubicada en el centro de Colombia.
<i>G. calderoniana</i> Londoño & Judziewicz:	Atlántico brasileño -Bahía y Espiritu Santo.
<i>G. capitata</i> (Trinius) Munro:	Encontrada en el Centro de Brasil y Bolivia.
<i>G. chacoensis</i> (Rojas) Londoño & Peterson	Ubicada en el norte de Argentina, sureste de Bolivia y sur de Paraguay.
<i>G. ciliata</i> Londoño & Davidse:	Registrada en el sur del Amazonas, Venezuela, noroeste de Amazonas, y Brasil.
<i>G. glomerata</i> Munro:	Distribuida en Colombia, Venezuela, Ecuador, Perú, las Guyanas y la Amazonía brasileña.
<i>G. latifolia</i> (Humboldt & Bonpland) Kunth:	Inventariada en Venezuela, las Guyanas y la frontera con Brasil)
<i>G. longifolia</i> (E. Fournier) R. Pohl:	Distribuida desde el sur de México hasta Honduras.
<i>G. macclurei</i> R. Pohl & Davidse:	Distribuida desde Honduras hasta Panamá.
<i>G. macrostachya</i> Ruprecht:	Ubicada en la Guyana Francesa y el este de la Amazonia brasileña.
<i>G. maculosa</i> (Hackel) E.-G. Camus:	Registrada en el Brasil central.
<i>G. paniculata</i> Munro :	Distribuida desde el oeste de México -Nayarit- hasta el este de Venezuela, Colombia, Bolivia y Brasil.
<i>G. paraguayana</i> Doell in Martius:	Encontrada en Paraguay y noreste de Argentina.
<i>G. refracta</i> Munro:	Ubicada en Brasil.
<i>G. sarcocarpa</i> * Londoño & Peterson	Inventariada en el oeste de la Amazonia.
<i>G. sarcocarpa</i> subsp. <i>purpurea</i> Londoño & Peterson:	Distribuida desde el centro de en Pasco hasta el centro de Bolivia en Santa Cruz.
<i>G. sarcocarpa</i> subsp. <i>sarcocarpa</i> :	Registrada en Cuzco - Perú; Acre - Brasil y Santa Cruz - Bolivia -Santa Cruz-)
<i>G. superba</i> Huber :	Encontrada en el oeste de la Amazonia, desde Colombia hasta el oeste de Brasil y Bolivia.
<i>G. tagoara</i> (Nees) Kunth:	Registrada en Brasil atlántico –desde Bahía hasta Santa Catarina.
<i>G. trinii</i> (Nees) Ruprecht:	Ubicada en el sureste de Brasil, norte de Argentina y Uruguay.
<i>G. velutina</i> Londoño & L. G. Clark:	Distribuida desde el este de México -Tamaulipas hasta Oaxaca.
<i>G. venezuelae</i> Munro:	Inventariada en Venezuela.
<i>G. virgata</i> (Trinius) Ruprecht:	Registrada en el centro de Brasil.
<i>G. weberbaueri</i> Pilger:	Ubicada en la Amazonia de Colombia y Venezuela hasta Surinam, Perú y Norte de Bolivia.

La combinación de caracteres que definen el complejo *G. angustifolia* se exponen a continuación. Según Young y Judd (1992). En las figuras 1.2.24 A, B y C se resume la taxonomía básica de *G. angustifolia*.

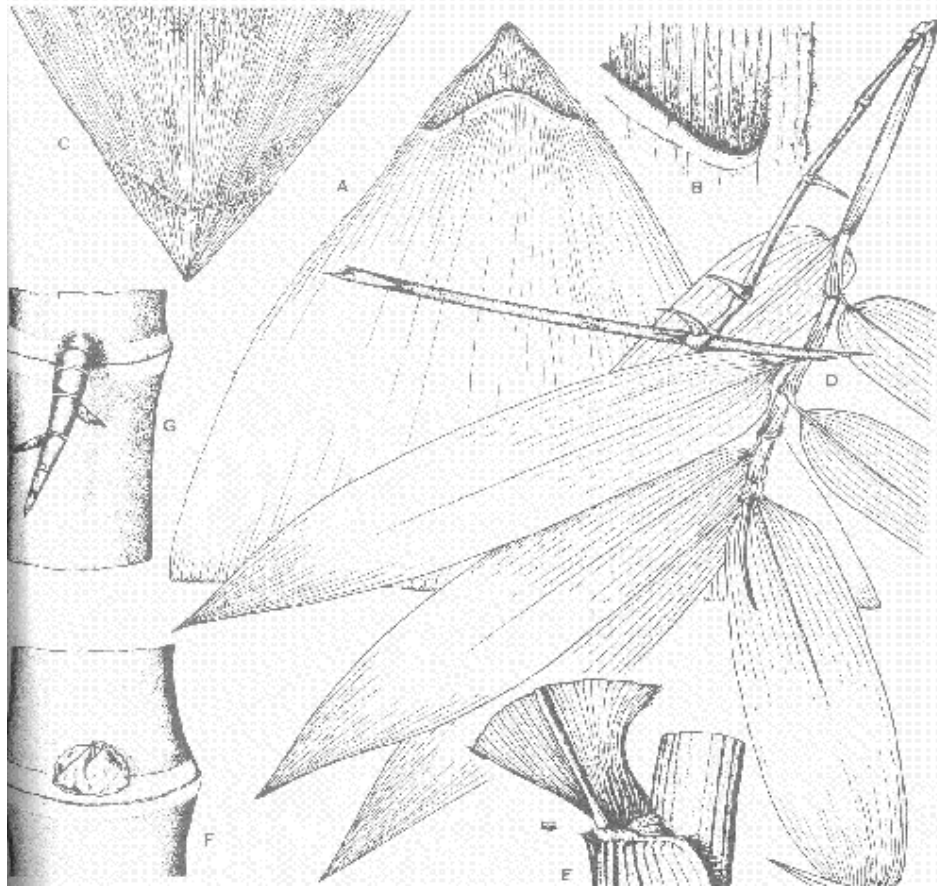


Figura 1.2.24A. *G. angustifolia*. A. bráctea del culmo vista por el lado interno; B. detalle ampliado de la base de la bráctea del culmo; C. porción superior de la bráctea del culmo vista por la cara externa; D. porción de las ramas de primer orden en las cuales se observan espinas; E. ápice de la bráctea de la hoja y base de la hoja; F. nudo del tallo con la yema de las ramas; G. brote de una rama espinosa en un nudo inferior del tallo (Hidalgo 1974).

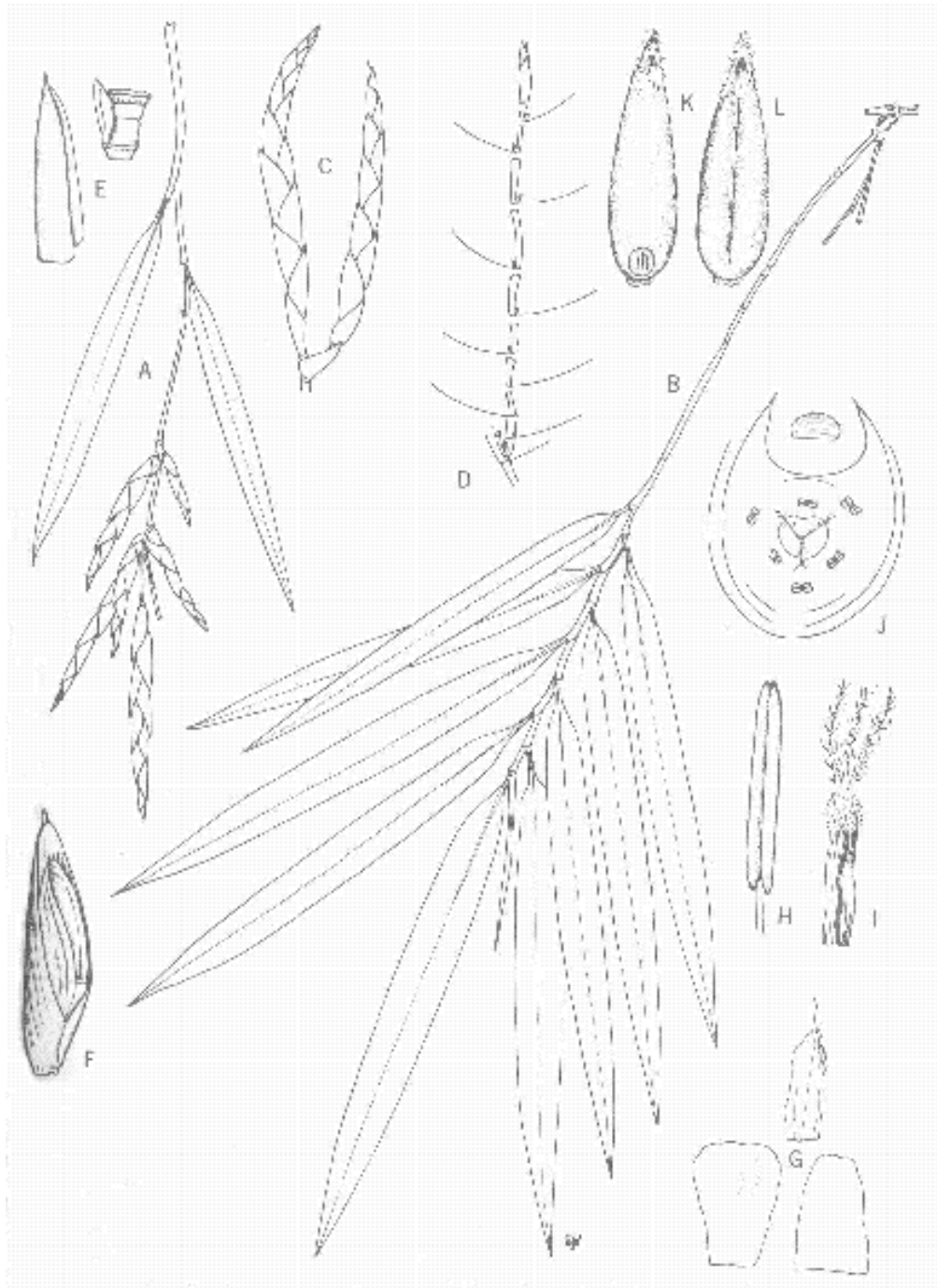


Figura 1.2.24B. *G. angustifolia*. A. rama florecida; B. rama estéril; C. par de pseudoespigas; D. diagrama de la sección longitudinal de una pseudoespiga; E. bráctea y yema; F. flósculo; G. complemento de la lodícula; H. estambres; J. diagrama de la sección transversal del flósculo; K. fruto, lado del embrión; L. fruto, lado del folículo (Hidalgo 1974).

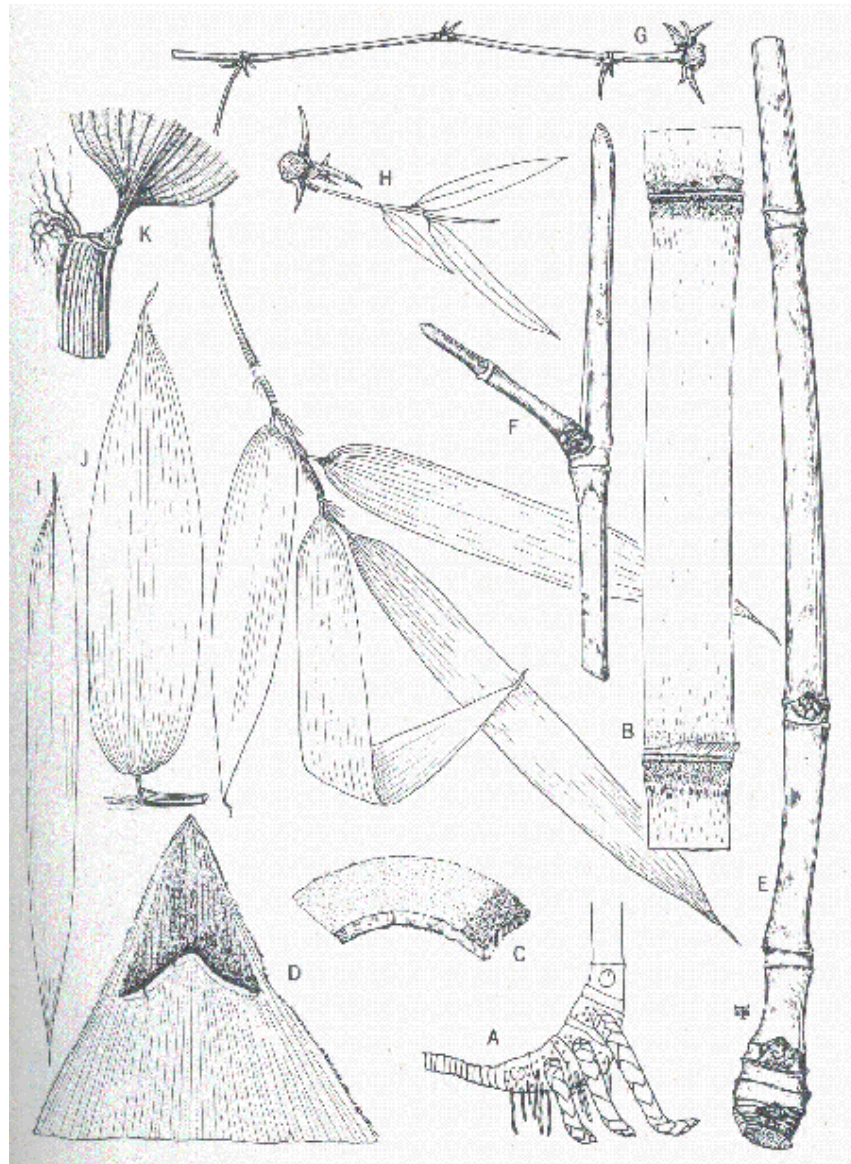


Figura 1.2.24C. *G. angustifolia*. A. base del culmo con su rizoma; B. corte tangencial del internudo y nudos; C. sector de la sección transversal de la pared del tallo; D. ápice de la bráctea del culmo, vista por el lado interno; E. parte basal de las ramas de primer orden de un nudo intermedio del culmo que muestra yemas intactas; F. ramas de segundo orden con yemas aún intactas; G. ramas de tercer orden mostrando espigas y follaje; H. complemento de la espina con una rama que sale del nudo más próximo a la espina; I y J. ejemplos de formas de hojas; K. ápice de la bráctea de la hoja y base de la misma (Hidalgo 1974).

Los culmos de gran estatura (de 10 a 30 m de altura, erectos con arco en la parte superior (Figura 1.2.6); paredes entrenodales de mediano grosor, hojas del culmo largas, pubescencia abaxial, y usualmente sin aurículas; vainas de hojas glabras o pubescentes hacia el nervio central de la mitad más baja, algunas veces aproximándose al ápice pero nunca presente allí; hojas en forma de sable con 10-15 centímetros de largo y 1-4 centímetros de ancho, de superficie glabra o parcialmente pubescente, peciolo glabro a lo largo del nervio central de la superficie abaxial. La sinflorescencia consiste de 2 a 5 delicadas pseudolanzas multifloradas, ramitas ramificadas (Figura 1.2.11); la florescencia principal es de 2-9 centímetros de largo y 3-8 centímetros de ancho, floretes 3-14 (Figura 1.2.13); superficie de brácteas y lemas glabra o con pelos hialinos esparcidos en la base, centro y orillas, raro densamente pubescente en la base y el centro, márgenes glabros; quilla palea (o diversa) con pubescencia marginal exerta más allá de las lemas; 3 lodículas.

La mayoría de las especies no crecen más de 10 m, sin embargo *G. angustifolia* usualmente crece entre 10 y 20 metros, hasta los 30 m incluso. En las tablas 1.7 y 1.8 se resumen las características vegetativas y reproductivas para diferenciar *G. angustifolia* subsp. *angustifolia* de otras especies simpátricas (*G. complixifolia* forma "culmo sólido"; *G. amplexifolia* forma "culmo hueco"; *G. longifolia*; *G. paniculata*), y de *G. angustifolia* subsp. *chacoensis* (*G. paraguayana*; *G. trinitii*; *G. tagoara*; *G. paniculata*), según Young y Judd (1992). A continuación se registran los nombres vernáculos más usados en Latinoamérica para referirse a *G. angustifolia*.

<b>Países</b>	<b>Nombre vernáculos</b>
Argentina y Brasil	taboca y tacuara
Perú	paca o caña de Guayaquil
Amazonia	yaripa
Ecuador	caña guadua, caña mansa, caña brava
Colombia	guadua
Costa Rica	guadua
Venezuela	Jua-jua, Puru-puru



Tabla 1.7. Comparación morfológica de *Guadua angustifolia* subsp. *angustifolia* y de otras especies simpátricas de guadua (Young y Judd 1992).

Características	<i>G. angustifolia</i> subsp. <i>angustifolia</i>	<i>G. amplexifolia</i> f. "culmo sólido"	<i>G. amplexifolia</i> f. "culmo hueco"	<i>G. longifolia</i>	<i>G. paniculata</i>
Culmos	Erecto; 10-30 m de altura, 10-20 cm de diámetro; paredes medias delgadas	Erecto; 8-10 m de altura, 6-10 cm de diámetro; sólido con médula al centro	Erecto; 8-10 m de altura, 6-10 cm de diámetro; pared delgada	Trepador; 15 m de largo a 5 cm de diámetro; pared delgada	Débilmente erecto; 8-9 m de altura, 5-7 cm de diámetro; pared delgada
Brácteas culmonares	café pubescente; decidua lámina 1/4 o menos del largo de la hoja, persistente; aurículas ausentes	café pubescente; tardíamente decidua a persistente y descompuesta; lámina 1/3 a 1/2 del largo de la hoja, persistente; aurículas presentes a ausentes	café pubescente; tardíamente decidua a persistente y descompuesta; lámina 1/3 a 1/2 del largo de la hoja, persistente; aurículas largas presentes	Ligeramente blanco pubescente; puntualmente decidua; lámina aprox. 1/3 del largo de la hoja, base mucho más baja en un lado; aurículas ausentes	verde-amarillo con franjas horizontales púrpura, pubescente; vaina tardíamente decidua; lámina 1/2 a 1/3 del largo de la hoja, caduca desde la vaina; aurículas ausentes
Espinas	Presentes a raramente ausentes; 1-5 en el nudo, corta a larga	Presentes; 1-5 en el nudo, corta a larga	Ausente a muy esparcida; pocas en el nudo si están presentes; corta	Presente; 1 o raramente 2 en el nudo, apuntando hacia abajo	Presente; usualmente 3 en el nudo; bastante larga, delgada y muy aguda
Hojas de ramas	Lámina media ancha; vaina gabrosa a pubescente a lo largo del nervio central de la mitad más baja; peciolo abaxial glabroso; aurícula ausente a raramente presente	Lámina talla media a ancha; vaina gabrosa a totalmente pubescente, generalmente en los bordes más bajos o mitad superior; peciolo abaxial glabroso; aurícula ausente a presente	Lámina ancha; vainas usualmente glabras; peciolo abaxial glabroso; aurícula presente	Lámina muy estrecha; vaina gabrosa a raramente pubescente; peciolo abaxial glabroso a pubescente; aurícula presente a ausente	Lámina estrecha, colgante; vaina pubescente; peciolo abaxial pubescente; aurícula ausente
Espigillas	Corta a larga, estrecha, aplanada; 1-3 por grupo; glabrosa a ligeramente pubescente	Larga y ancha, raramente corta, redonda; usualmente 3 o más por grupo; glabrosa a raramente pubescente	Igual como "culmo sólido"	Muy larga y estrecha, redonda; 1-3 por grupo; glabrosa	Corta y estrecha, aplanada; usualmente 3 o más por grupo; pubescente



Tabla 1.8. Comparación morfológica de *Guadua angustifolia* subsp. *chocoensis* y de otras especies simpátricas de guadua (Young y Judd 1992).

Características	<i>G. angustifolia</i> subsp. <i>chocoensis</i>	<i>G. paraguayana</i>	<i>G. trinii</i>	<i>G. tagoara</i>	<i>G. paniculata</i>
Culmos	10-15 m de altura, 8-10 cm de diámetro	8-10 m de altura, 2-4 cm de diámetro	8-10 m de altura, 3-5 cm de diámetro	8-10 m de altura, 6-8 cm de diámetro	8-9 m de altura, 5-7 cm de diámetro
Brácteas culmonares	café pubescente; lámina 1/3 o menos del largo de la hoja, persistente; aurículas ausentes	café pubescente; lámina 1/3 del largo de la hoja, persistente; aurículas presentes	café pubescente; lámina 1/2 del largo de la hoja, persistente; aurículas ausentes	café pubescente; lámina 1/6 del largo de la hoja, mucho más ancha que larga, persistente; aurículas ausentes	verde-amarillo con franjas horizontales púrpura; lámina 1/2 a 1/3 del largo de la hoja, caduca desde la vaina; aurículas ausentes
Hojas de ramas	Lámina talla media a estrecha; vainas glabras; peciolo abaxial glabro	Lámina talla media a estrecha; vainas con pelos en uno o en ambos lados del ápice; peciolo abaxial pubescente en uno o ambos lados	Lámina talla media a estrecha; vainas glabras a pubescentes en el ápice; peciolo abaxial glabro a pubescente	Lámina ancha; vainas pubescentes en un lado del ápice; peciolo abaxial glabro	Lámina estrecha, colgante; vainas pubescentes; peciolo abaxial pubescente
Espigillas	Larga y ancha, glabra a ligeramente escabrosa; alas de la pálea excertas, ciliadas	Larga a corta y estrecha, pubescente; alas de la pálea usualmente no excertas, ciliadas	Corta y estrecha, glabra; las de la pálea ampliamente excertas, glabras a minuciosamente ciliadas	Corta y estrecha, glabra; alas de la pálea ampliamente excertas, no ciliadas	Corta y estrecha, pubescente; alas de la pálea no excertas, ciliadas

## 1.2. Antecedentes citogenéticos

La especie *Guadua angustifolia* es uno de los bambúes americanos con importancia a nivel mundial. Es el tercer bambú más alto del mundo superado únicamente por dos especies asiáticas (Cruz 2009). Está distribuido a través de Colombia, Ecuador y Venezuela (Marulanda et al. 2007) y ha sido introducido en varios países de Centro América, el Caribe y Asia. En Colombia, *G. angustifolia* se encuentra desde los 40 hasta los 2400 msnm. Según la Sociedad Colombiana del Bambú esta especie se encuentra distribuida a lo largo de la cordillera central, en los

departamentos de Antioquia, Cauca, Caldas, Cundinamarca, Huila, Quindío, Risaralda, Tolima y Valle del Cauca; sin embargo, los rodales más desarrollados se encuentran especialmente en los bosques húmedos y muy húmedos, encontrándose en mayor número en las laderas de montaña, cerca de fuentes hídricas; mientras que en el departamento del Quindío, el 90% de los guaduales se encuentra en zonas planas o en ondulaciones suaves (Cruz 2009).

*Guadua angustifolia* presenta dificultades en su clasificación taxonómica, algunos autores han señalado que dentro de la especie se pueden identificar cuatro variedades, por esta razón, Rodríguez et al. (2010) una vez estandarizaron el protocolo para la obtención de células metafásicas determinaron el número cromosómico básico de las cuatro variedades de *Guadua angustifolia* Kunth: (Var. *angustifolia*, Var. *bicolor*, Var. *grandicaula* y Var. *angustifolia*) y las caracterizaron cariotípicamente. Los resultados mostraron una dotación cromosómica de  $2n=46$ , arreglados en 23 parejas, clasificados en cinco de las seis categorías de nomenclatura cromosómica, siendo la categoría telocéntrica la que más se presenta con el 35% de las parejas. En este estudio se considera que las cuatro variedades de la especie son bambú leñoso diploide coincidiendo con algunos de los reportes existentes para el género y se propone que éstos, según su tamaño, se clasificaron como pequeños y fueron agrupados en cinco niveles de tamaño que están entre 1,5  $\mu m$ . y 0,6  $\mu m$ . El cariotipo para la especie es de tipo asimétrico con un índice intracromosómico de 0.987. Para contribuir al esclarecimiento taxonómico.

Valencia et al (2012) caracterizaron el cariotipo de *Guadua angustifolia* var, *angustifolia*. Para este fin, evaluaron la morfología cromosómica de esta especie a partir de tejido meristemático radicular. Los resultados mostraron que la dotación cromosómica de *Guadua angustifolia* es igual  $2n=2X=46$ , Con un valor de  $X=23$ , siendo este el primer reporte citogenético para esta especie (figura 1.2.25). La caracterización morfológica de los cromosomas permitió establecer la presencia de 4 categorías cromosómicas siendo la metacéntrica la más frecuente (39% del cariotipo). Se clasificaron los cromosomas según su tamaño en 5 categorías relativas que oscilan entre 0,6 y 1,5  $\mu m$  de longitud (figura 1.2.26). Estas

observaciones coinciden con reportes previos sobre el cariotipo de la especie, la cual es considerada como un diploide funcional (Andrada et al. 2007). En conclusión, *Guadua angustifolia* es diploide con  $2n=46$ , con cromosomas de tamaño pequeño que oscilan entre 1,5  $\mu\text{m}$  y 0,6  $\mu\text{m}$ , y un índice de asimetría intracromosómico de 0,984, características que sugieren que la especie presenta cambios evolutivos recientes.

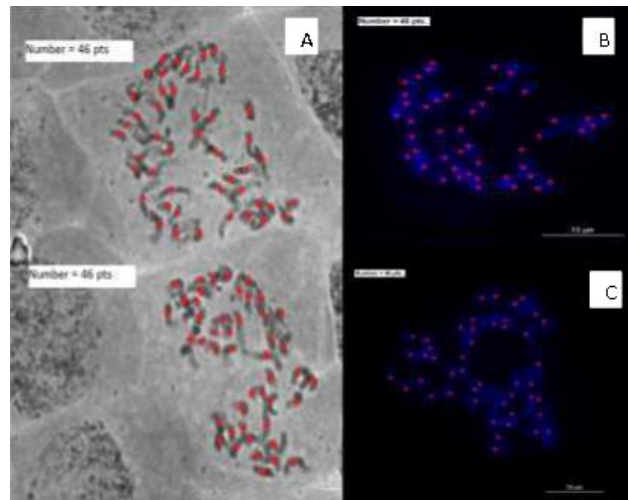


Figura 1.2.25. Microfotografías de cromosomas metafásicos de *G. angustifolia* var. *angustifolia* A. en contraste de fases. B y C Tinción con DAPI, conteo cromosómico realizado con el Software LUCIA. Campo visual 100X. Tomado de Valencia et al (2012).

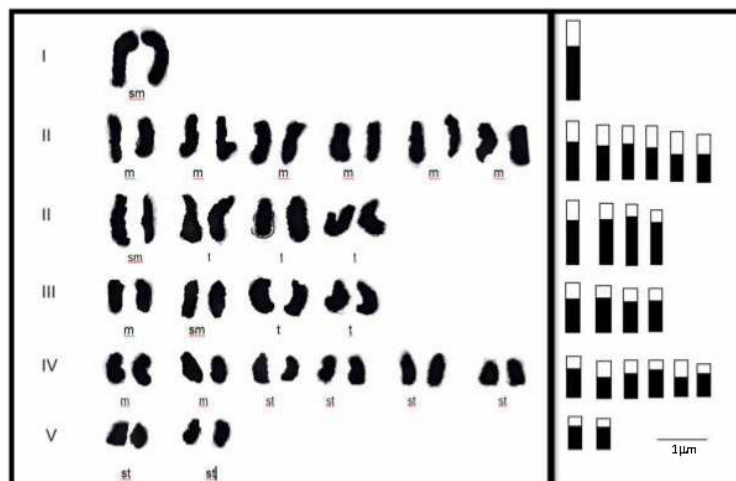


Figura 1.2.26 Cariotipo e ideograma de *Guadua angustifolia* var. *angustifolia* biotipo macana, según la posición relativa del centrómero (100X). Tomado de Valencia et al (2012).

### 1.3. Antecedentes filogenéticos moleculares

Los bambúes son un elemento común en el continente americano. Se registran bambúes nativos en todos los países del Nuevo Mundo con excepción de Canadá. Por su rápido crecimiento, gran versatilidad y resistencia, esta maravillosa gramínea ha sido de gran utilidad para el hombre a lo largo de su historia.

Los bambúes son plantas extremadamente diversas y económicamente importantes que crecen en regiones tropicales y templadas de Asia, África, Australia y América. Se conocen como las gramíneas más grandes del mundo y se distinguen del resto de ellas por tener (1) el hábito perenne, (2) los rizomas bien desarrollados, (3) los culmos casi siempre lignificados y fuertes, (4) las hojas pecioladas, (5) el embrión pequeño en comparación con el endospermo, (6) presencia de 3 lodículas en el antecio, (7) las plántulas con la primera lamina ancha y en posición horizontal, (8) el mesófilo no radiado con células fusoides y células raquimorfias, (9) los haces vasculares usualmente en cantidades mayores de uno y superpuestos en la nervadura central, y (10) los cuerpos silíceos verticalmente orientados (Soderstrom & Ellis, 1987).

En el mundo existe un total de 101 a 118 géneros y 1400 especies (1290 especies leñosas y 110 especies herbáceas), que se distribuyen desde los 51° de latitud Norte (Japón) hasta los 47° de latitud Sur (Chile) y desde el nivel del mar hasta los 4300 metros de altura reportada en los Andes ecuatoriales en la formación conocida como Páramo. Los bambúes prefieren los hábitats húmedos de las selvas nubladas y selvas bajas tropicales aunque algunos crecen en hábitats secos como *Dendrocalamus strictus* (Roxburgh) Nees del Asia y *Guadua amplexifolia* Presl del Nuevo Mundo.

En América, existen 41 géneros y 473 especies, aproximadamente la tercera parte de la diversidad mundial, los cuales se distribuyen desde los Estados Unidos con *Arundinaria gigantea* (Walter) Muhlenberg y dos especies más, a lo largo y ancho de Centro y Suramérica, en las Islas del Caribe, hasta el sur de Chile, con *Chusquea*

*culeou* Desvoux. Se reconoce como el área de mayor grado de endemismo y diversidad la "mata littoranea" del sur de Bahía, Brasil con presencia del 48% (22 géneros) de todos los géneros americanos, cuatro (4) de los cuales son endémicos. Le sigue en diversidad la cordillera de los Andes desde Venezuela hasta Bolivia, y la parte sur de Mesoamérica.

De los países Americanos, Brasil tiene la mayor diversidad de bambúes con un total de 202 especies de las cuales 137 especies son bambúes leñosos y 65 son bambúes herbáceos, le sigue Colombia con 92 especies (70 spp. leñosos + 22 spp. herbáceos), Venezuela con 81 especies (60 spp. leñosos + 21 herbáceos), Ecuador con 50 especies (42 spp. leñosos + 8 spp. herbáceos), Costa Rica con 47 especies (39 spp. leñosos y 8 spp. herbáceos), y México con 41 especies (37 spp. leñosos y 4 spp. herbáceos).

Los bambúes pertenecen a la familia Poaceae y a la subfamilia Bambusoideae, y se han dividido en dos grandes tribus: 1) Olyreae o de los bambúes herbáceos, y 2) Bambuseae o de los bambúes leñosos.

La tribu *Olyreae* en América reúne un total de 20 géneros y aproximadamente 110 especies de bambúes herbáceos. Se reconocen 3 regiones particularmente ricas en este tipo de bambúes: la región de Bahía, en el oriente del Brasil; la región norte del Brasil (Amapa y las Guayanas); y la región del Choco, en Panamá y Colombia (Soderstrom et al 1988).

La tribu *Bambuseae* en América reúne los bambúes leñosos y tienen como centro de diversidad la cordillera de los Andes, albergando el 33% de las especies (Clark, 2001). Se sabe por ejemplo, que estos bambúes presentan un incremento en su diversidad a medida que se asciende en las montañas, observándose una mayor concentración de especies entre los 2000-3000 m sobre el nivel del mar. Por debajo de los 1000 m de altitud, la diversidad disminuye registrándose un mayor incremento en el número de individuos en el rango de especie y un predominio de los géneros *Arthrostylidium*, *Guadua* y *Rhipidocladum*. Por encima de los 3000 m únicamente se encuentran especies de los géneros *Chusquea*, *Neurolepis* y *Aulonemia* (Clark,

1989, 1993; 2001; Londoño, 1990). En Colombia, la mayor diversidad de bambúes leñosos se da en la región Andina entre los 2000 y los 3000 m de altitud, y de las tres Cordilleras, la Cordillera Oriental es la más rica en diversidad específica con el 65% de los bambúes hasta ahora reportados, le sigue en abundancia y diversidad la cordillera Central con 60% y la Occidental con 37% (Londoño, 1990).

Filogenéticamente, las subfamilias *Anomochlooideae* y *Pharoideae*, antes reconocidas como bambúes herbáceos *sensu lato*, son los dos clados más basales dentro de la familia *Poaceae* o de las gramíneas. La subfamilia *Anomochlooideae* es endémica del Nuevo Mundo y está conformada por dos tribus: *Anomochloaeae* y *Streptochaeteae*, y por dos géneros (*Anomochloa* (1 sp.) y *Streptochaeta* (3 spp.)). La subfamilia *Pharoideae* es pantropical, con una tribu, tres géneros (*Pharus*, *Leptaspis* y *Scrotochloa*) y 14 especies; *Pharus* es endémico de América. Las subfamilias Bambusoideae (bambúes) y Ehrhartoideae (arroz) son grupos hermanos y juntas conforman un clado que es hermano con las Pooideae. La subfamilia Ehrhartoideae está representada en el Nuevo Mundo por tres tribus: *Ehrharteae*, *Oryzeae* y *Streptogineae*, 8 géneros y 33 especies. La subfamilia Bambusoideae incluye dos tribus: *Bambuseae* (bambúes leñosos) y *Olyreae* (Bambúes herbáceos) y está representada en América por 41generos y 473 especies (Judziewicz & Clark, 2004 - en prensa).

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética en bambúes se ha incrementado en los últimos años. Se conocen estudios de filogenia utilizando fragmentos de ADN cloroplástico de bambúes Asiáticos (Watanabe et al. 1994) y bambúes del nuevo mundo (Kobayashi 1997); y el uso de marcadores de ADN cloroplástico para determinar relaciones filogenéticas en el género *Chusquea* (Kelchner y Clark 1997). El primer análisis filogenético molecular del mayor clado de bambús leñosos del viejo mundo con secuencias de ADNcp y nucleares asociándolos a características de los frutos lo realizaron Yang et al. (2008); se encontró que elementos transponibles son frecuentes en bambúes y se realizaron análisis filogenéticos con las secuencias (Zhou et al. 2010). Se usan ocho regiones no codificantes de ADNcp en 146 especies de 26 géneros de la tribu *Arundinarieae*

para establecer relaciones entre especies y en especies americanas, Ruiz-Sánchez (2010) con características morfológicas y moleculares sugiere que en el género *Oatea* se tengan siete entidades en lugar de tres.

#### 1.4. Distribución Geográfica

Los bambúes leñosos de la subfamilia *Bambusoideae* están ampliamente distribuidos a través de los trópicos, específicamente los del género *Guadua* Kunth son comunes en las regiones bajas de América Latina. El género *Guadua* se distribuye desde el sur de México hasta el norte de Argentina con grandes vacíos en su distribución, actualmente no es muy común en América Central debido a la extracción masiva de culmos para la elaboración de varas para apuntalar banano en grandes plantaciones (Figura 1.2.27, Young y Judd 1992) ().



Figura 1.2.27. Distribución natural del género *Guadua*, género de origen americano (Judziewicz et al. 1999).

*G. angustifolia* es la especie de *Guadua* con mayor distribución continental, se encuentra desde el norte de Perú, a través de Ecuador, Colombia y América Central hasta el sur de México, generalmente cerca de cursos de agua (Young y Judd 1992; Judziewicz et al. 1999); *G. angustifolia* subsp. *angustifolia* es conspicuamente ausente en la mayor parte de Nicaragua y en todo Costa Rica; en Panamá y sobre la frontera oeste colombiana no hay colecciones. En contraste alcanza su clímax ecológico en Colombia y Ecuador en las llanuras húmedas tropicales, bosque tropical montano bajo, bosque semidecíduo, deciduo y en las sabanas (Harding 1972 mencionado por Young y Judd 1992) (Figura 1.2.28).

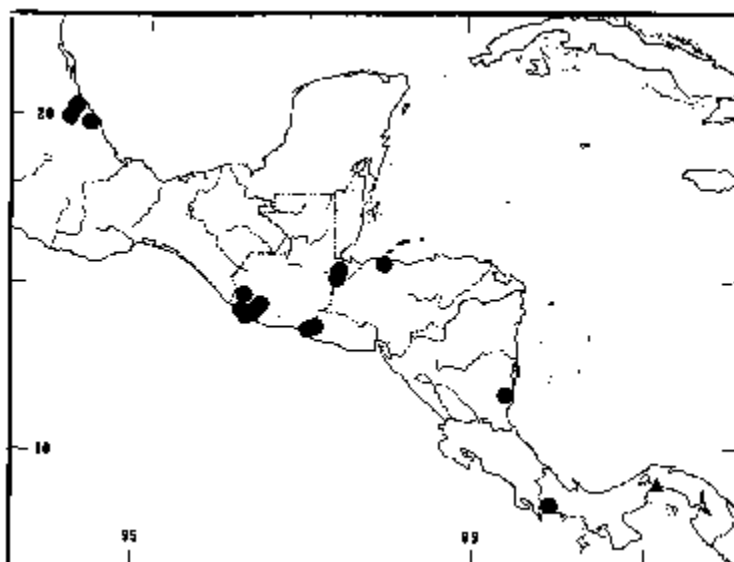


Figura 1.2.28. Distribución de las poblaciones norteñas (América Central) de *Guadua* subsp. *angustifolia*. Círculos = plantas nativas, triángulos = plantas posiblemente cultivadas (Young y Judd 1992).

*G. angustifolia* subsp. *chacoensis* se encuentra a lo largo de los ríos en el noreste de Argentina y el este de Paraguay, y está geográficamente aislada de las poblaciones sureñas de *G. angustifolia* subsp. *angustifolia* (Figura 1.2.31, Young y Judd 1992; Judziewicz et al. 1999).



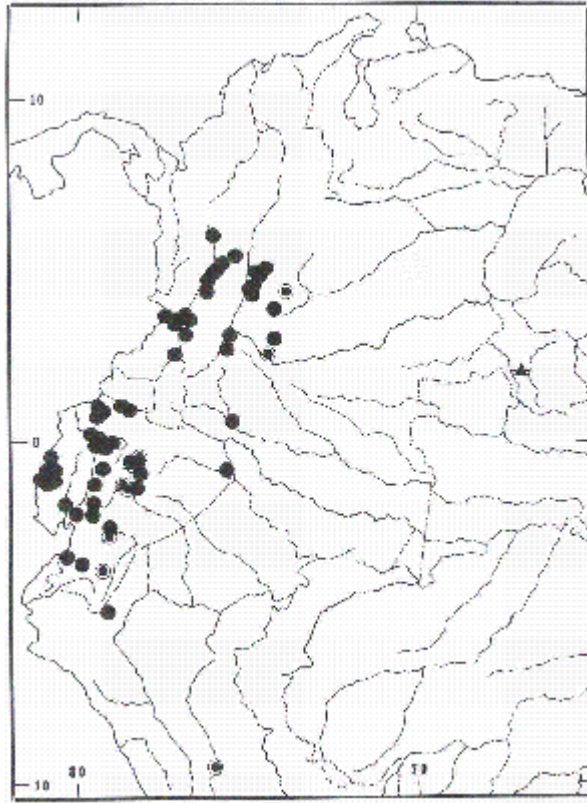


Figura 1.2.29. Distribución de las poblaciones sureñas (noroeste de América del Sur) de *Guadua* sub.sp. *angustifolia*. Círculos solos = distribución oeste; círculo dentro de círculo = distribución este, triángulos = plantas posiblemente cultivadas (Young y Judd 1992).

La especie más norteña es *G. velutina* Londoño & LG Clark que se encuentra en San Luis Potosí México (23° Norte), mientras que la más sureña *G. trinii* (Nees) Ruprecht en Uruguay y Argentina (35° Sur); este género no es nativo de Chile ni de las Indias Occidentales. *G. angustifolia* fue introducida y cultivada en Cuba, Puerto Rico y Trinidad y Tobago (Judziewicz *et al.* 1999).

*G. angustifolia* es la especie de *Guadua* con mayor distribución continental, se encuentra desde el norte de Perú, a través de Ecuador, Colombia y América Central hasta el sur de México, generalmente cerca de cursos de agua (Young y Judd 1992; Judziewicz *et al.* 1999); *G. angustifolia* subsp. *angustifolia* es conspicuamente ausente en la mayor parte de Nicaragua y en todo Costa Rica; en Panamá y sobre la frontera oeste colombiana no hay colecciones. En contraste, alcanza su clímax

ecológico en Colombia y Ecuador en las llanuras húmedas tropicales, bosque tropical montano bajo, bosque semidecíduo, decíduo y en las sabanas (Harding 1972 mencionado por Young y Judd 1992; Figura 1.2.28).

La *Guadua angustifolia* se encuentra en estado natural en Colombia, Ecuador y Venezuela, en donde forma colonias dominantes conocidas popularmente como “guaduales” concentrados principalmente en la región andina, entre los 0 y 2000 msnm; se observa principalmente a la orilla de ríos y quebradas, en el pie demente de la cordillera, en los bosques montanos medio y bajo y en los valles interandinos (Figura 1.2.30). La *Guadua angustifolia* ha sido introducida a varios países de Centroamérica y del Caribe, e inclusive al Asia, Norteamérica y Europa (Giraldo y Sabogal 1999). En Colombia, los guaduales se desarrollan de manera optima en la región central de los Andes entre los 500 y 1500 metros con temperaturas entre 17°C y 26 °C, precipitaciones de 1200-2500 mm/año, humedad relativa del 80-90% y suelos aluviales ricos en cenizas volcánicas con fertilidad moderada y buen drenaje.



Figura 1.2.30. Cultivo de guadua en la zona cafetera de Colombia. Tomado de “el bambú como material estructural, análisis de un caso práctico. Escuela Politécnica Superior.

Por su ubicación sobre las faldas de las cordilleras occidental y central y el valle de varios ríos posee todos los pisos térmicos, lo cual propicia el crecimiento de gran diversidad de especies. En Colombia, la guadua es un elemento muy característico del paisaje y constituye la base constructiva del eje cafetero, en particular. Esta región, tiene una extensión de 13.346 km<sup>2</sup> y una población aproximada de 1.600.000 habitantes.

## **1.5. Importancia**

### **1.5.1. Importancia Ambiental**

La guadua es una planta que aporta múltiples beneficios para el medio ambiente y el hombre, sus productos cuando son empleados como elementos integrales de la construcción de viviendas funcionan como reguladores térmicos y de acústica, el rápido crecimiento de la guadua permite según el “estudio aportes de biomas a aérea realizado en el centro nacional para el estudio del Bambú-Guadua, producir y aportar al suelo entre 2 y 4 ton/ha/año de biomasa, volumen que varía según el grado de intervención del guadua; esta biomasa constituye entre el 10 y el 14% de la totalidad de material vegetal que se genera en un guadua. La biomasa es importante, ya que contribuye a enriquecer y mejorar la textura y estructura del suelo. El aporte anual de biomasa general de un guadua en pleno desarrollo oscila entre 30 y 35 ton/ha/año (Villegas M. 1996).

Los rizomas y hojas en descomposición conforman en el suelo miles de esponjas, evitando que el agua fluya de manera rápida y continua, con lo cual se propicia la regulación de los caudales y la protección del suelo a la erosión. El sistema entretejido de rizomas y raicillas origina una malla, que les permite comportarse como eficientes muros biológicos de contención que controlan la socavación lateral y amarran fuertemente el suelo, previniendo la erosión y haciendo de la guadua una especie con función protectora, especial para ser usada en suelos de ladera de cuencas hidrográficas.

El agua proveniente de la lluvia que cae sobre el guadual, permanece mucho tiempo en él, toma diversos caminos y tarda más tiempo en caer al suelo, dando como resultado la “regulación de caudales,” ya que si la misma cantidad de agua se precipitara sin obstáculos ocasionaría crecidas súbitas y no se formarían reservas que son empeladas dentro del sistema cuando se requiere, especialmente en épocas de verano. Adicionalmente el dosel o bóveda que se conforma por el follaje en riveras de fuentes de agua impiden las perdidas por altas y rápidas tasas de evaporación (súbita) contribuyendo así a la mencionada regulación.

Entre los aportes más valiosos de la especie se debe mencionar su comportamiento como una bomba de almacenamiento de agua, cuyo funcionamiento es el principio de “vasos comunicantes” donde en épocas húmedas absorbe importantes volúmenes de agua que almacena tanto en su sistema rizomático como en el tallo, se ha determinado, según estudios realizados en la hacienda Nápoles, municipio de Montenegro y en el centro nacional para el estudio del bambú-guadua (Giraldo et al. 1995) que una hectárea de guadua puede almacenar 30.375 litros de agua, es decir, el agua para 150 personas por día (se asume un consumo promedio de 200 litros/día/persona). En época de verano cuando se percibe la necesidad de agua en el suelo, la que se encuentra almacenada en la planta es aportada de manera paulatina al suelo (esponja que suelta líquido).

Los guaduales cumplen en la zona cafetera colombiana papel relevante puesto que han propiciado la existencia y sostenibilidad de flora, microflora, entomofauna, mamíferos, aves, reptiles y anfibios. Se resalta que en estos nichos ecológicos o comunidades es la especie dominante y a ella se asocia vegetación muy variada y numerosa que le permite conformar una estructura vertical triestratofítica, característica de las sociedades vegetales altamente desarrolladas y evolucionadas que tolera una amplia interrelación entre los diferentes componentes del sistema.

Giraldo *et al.* 1997 (mencionado por Giraldo y Sabogal 1999) registraron 45 especies de plantas en 33 familias, 32 familias de insectos en 4 órdenes, 25 familias de aves en 13 órdenes, y dos familias de anfibios.

*Guadua angustifolia* Kunt es considerada una de la especies más dinámicas y especializadas de la Zona Andina Colombiana, en cuanto a su sostenibilidad, su oferta ambiental y su relación con otros seres vivos que conviven con ella. Se han registrado más de 1.000 especies de flora asociadas a los guaduales en Colombia (C.R.Q. [http://www.crq.gov.co/visual\\_crq/pagina11centroguadua.html](http://www.crq.gov.co/visual_crq/pagina11centroguadua.html)).

Muchos mamíferos conviven en los guaduales y su flora asociada, entre ellos se destacan los monos aulladores, guatines, ardillas, armadillos, guaguas, conejos silvestres, zarigüeyas y murciélagos. Por la facilidad para hacer sus nidos, muchas aves viven en los bosques de guadua, como los pájaros carpinteros real y payaso, azulejos, loros, pericos búhos, barranquillos y miras. Varias especies de reptiles y anfibios tienen su hábitat en los guaduales por sus condiciones de humedad. Otros servicios ambientales son: la regulación hídrica, ciclaje de nutrientes, estructuración de suelos, aporte de biomasa, captación de CO<sub>2</sub> y calidad del paisaje, entre otros (C.R.Q. <http://www.crq.gov.co/visualcrq/pagina11centroguadua.html>).

### **1.5.2. Importancia Ecológica**

En la zona andina colombiana, la Guadua está localizada en áreas estratégicas de las cuencas hidrográficas, donde cumple un elevado papel en la dinámica sucesional que le permite perpetuarse en el ecosistema, no obstante, por la gran actividad evolutiva de la especie, la mayoría de los guaduales pueden encontrarse muy densos de tallos por falta de manejo o muy intervenidos debido al aprovechamiento no técnico, que afecta la acción reguladora y el efecto de equilibrio biológico (Giraldo y Sabogal, 1996).

Comunidades vegetales como las de la Guadua deben manejarse técnicamente para obtener de ellas su mayor productividad y lograr que sean especializadas en

la regulación de caudales y en el aporte de cantidades significativas de biomasa en tiempo muy corto. El manejo se fundamenta en bases biológicas, ecológicas y estructurales con lo cual se logra su sostenibilidad en el tiempo y el espacio. Para que el guadua se considere bien manejado es necesario que cumpla tres condiciones fundamentales: sostenibilidad, máxima productividad y rentabilidad.

### **1.5.3. Importancia Socio-Cultural**

Desde épocas prehispánicas la guadua es el Bambú más ligado a la cultura del nuevo mundo. En la zona central de Colombia se han encontrado vestigios de esta especie en excavaciones arqueológicas de asentamientos indígenas. Su existencia ha generado leyendas míticas en las que se dice “Después del diluvio había quedado únicamente un hombre a quien el amo del cielo dio una guadua, que de la noche a la mañana convirtió en su mujer y compañera”. La guadua es un elemento simbólico que recoge referentes de un pasado cargado de gesta en el que se acuñaron los más destacados caracteres de la vida regional, hoy necesarios de rescatar. De la relación del hombre con su entorno (relación sociedad-naturaleza), mediante trabajo o la simple conservación, resultan “sentidos” afectivos o emotivos. Las comunidades incorporan como parte de suya los objetos sobre los cuales actúan; luego de la acción, los individuos pueden reconocerse en el objeto; es cuando se originan los afectos y la cultura. Es así como las viviendas que inicialmente se construyeron en guadua han recogido en su estructura y espacio muchos esfuerzos, sueños, anhelos y constituyen el referente inicial de la vida espiritual. Es por lo anterior que la guadua no se puede excluir fácilmente del paisaje, de la cotidianidad y de la memoria histórica de los pueblos.

La manera como la guadua ha penetrado directa e indirectamente en casi todos los ámbitos de la vida regional, amerita atención y tratamiento adecuado para garantizar su permanencia a largo plazo. Por ser la guadua una planta perenne, de alto rendimiento de madera por hectárea, por alcanzar su madurez en tiempo relativamente corto, por su longitud, trabajo y buena durabilidad esta especie se ha

convertido en un Bambú importante para la comunidad. Las condiciones favorables de sus propiedades físico-mecánicas, hacen que los tallos tengan muchos usos, a tal punto que los habitantes de la zona andina colombiana la utilizan en vivienda, utensilios de cocina, instrumentos musicales, puentes, canaletas, acueductos, horcones, lo que demuestra como llevan a la guadua a la cotidianidad.

#### **1.5.4. Importancia Económica**

En Colombia la guadua es la especie forestal nativa con mayores posibilidades económicas, ya que su utilización en la construcción y la industria, permiten reducir costos, cuando es empleada como materia prima. Por sus excelentes propiedades físico-mecánicas, por su resistencia al ataque de insectos, por su belleza escénica y tal vez, por lo más importante la diversidad de aplicaciones no igualadas por ninguna especie forestal, representa una alternativa económica que ha coadyuvado a mitigar la problemática social en el campo. Los guaduales viven y se desarrollan asociados a áreas de gran potencial agrícola, es decir, suelos ricos, jóvenes y de buena capacidad productiva, constituyendo además una especie de importancia en la economía del finquero, toda vez que la inversión en el mantenimiento y manejo anual representa apenas entre el 25 y 30 % de las ganancias que se logran al cosechar el guadual. Por esto se cultiva y resiembra con esmero, aunque no con intensidad.

En Colombia, aproximadamente 100.000 personas derivan su sustento del aprovechamiento manejo y comercialización de la Guadua, de donde obtienen hasta \$400 dólares mensuales, con un ritmo de trabajo de 4 días laborales en la semana. El Bambú-guadua además de ser materia prima de los pobres, de uso local y bajo costo, debe convertirse en fuente de industrialización con reconocimiento internacional, tal como se presentó en el acto de inauguración del V congreso internacional de Bambú realizado en San José de Costa Rica.

## **1.6. Condiciones ambientales para el desarrollo y cultivo de la guadua (*Guadua angustifolia*)**

La guadua posee amplio rango de distribución geográfica lo cual indica su adaptabilidad, hecho que está determinado por las condiciones edafoclimáticas; observaciones técnicas demuestran que el buen desarrollo de la planta está gobernada de manera directa por la calidad del sitio donde se desarrolle, la precipitación y la temperatura” (Giraldo et al. 1999).

### **1.6.1. Temperatura**

Es uno de los factores climáticos limitante en la distribución geográfica de esta especie. El rango óptimo oscila entre los 20 °C y los 26°C. Cuando se cultiva en lugares donde los rangos de temperatura se alejan del óptimo, los diámetros y las alturas de los tallos se reducen, afectándose notoriamente el desarrollo vegetativo a temperaturas bajas.

### **1.6.2. Latitud**

En Colombia la *Guadua Angustifolia*, crece entre los 0 y los 2000 metros sobre el nivel del mar, pero el desarrollo óptimo se logra entre los 900 y los 1600 m.s.n.m.

### **1.6.3. Precipitación**

Esta especie crece deficientemente en áreas donde la precipitación es inferior a 1200 mm anuales. Los mejores rodales de guadua, se presentan cuando el rango de precipitación se ubica entre los 2000 mm y los 2500 mm por año.



#### 1.6.4. Humedad Relativa

Factor muy importante en el desarrollo de la especie. La humedad que más favorece el desarrollo de los bosques de guadua, está comprendida entre el 75 % y el 85%.

### 1.7. Referencias

Actualidad y futuro de la arquitectura de bambú en Colombia.  
[http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6130/06\\_ESD\\_Cos\\_pp\\_35\\_81.pdf;jsessionid=B59F81F50EC0D006A03C4EBECDCA281A.tdx2?sequence=6](http://www.tdx.cat/bitstream/handle/10803/6130/06_ESD_Cos_pp_35_81.pdf;jsessionid=B59F81F50EC0D006A03C4EBECDCA281A.tdx2?sequence=6).

Agudelo, B. & I. Y. Toro, 1994. Evaluación del desarrollo de los bosques de *Guadua angustifolia* en la zona de jurisdicción de la CVC bajo diferentes condiciones de sitio, con fines de reforestación. Tesis. Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Forestal, Ibagué. Pp. 168.

Andrada A.; Lozzia M. y Cristóbal E. 2007. Contribución al conocimiento citológico de *Guadua chacoensis*, Rev, Lilloa, 2007; 44 (1-2): 3-6.

Cruz H. 2009. Bambú - Guadua, *Guadua angustifolia* Kunt,- Bosques Naturales en Colombia y plantaciones comerciales en México, 1era edición, Grafica olímpicas S.A.

Friar y Kochert 1994. A study of genetic variation and evolution of *Phyllostochys* (Bambusoideae: Poaceae) using nuclear restriction fragment lenght polymoyphisms. Theoretical and Applied Genetics. (89): 265- 270.

Giraldo Herrera, E.; Pineda C., M. S. y A. Sabogal Ospina, 1995 Evaluación de las modalidades educativas impartidas por el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua. Armenia, 1995. 157p. Trabajo de grado (Especialista en Educación Ambiental). Universidad del Quindío. Facultad de Formación Avanzada.

Giraldo, E; Sabogal, A. 1999. La guadua una alternativa sostenible: Técnicas de cultivo y manejo. Ed. Corporación Autónoma Regional del Quindío C.R.Q. Colombia. 192 p.

Giraldo, Edgar, Sabogal, Aureliano. 1999. "La *Guadua* angustifolia Kunth en Colombia". Corporación Autónoma del Quindío. Subdirección de Recursos Naturales y Educación Ambiental. Centro Nacional para el estudio del Bambú-Guadua. 18 p.

Gritsch, A.S., K.abranson, G.C. Camayo, M. Rashid, R.J. Murphy, J.C. Camargo & X. Londoño. 2004. Anatomical culm analysis of *Guadua angustifolia* in relation to age, site, and physic-mechanical properties. En Memorias. Simposio Internacional Guadua 2004, Pereira, Septiembre 27 a 2 Octubre, 2004. Pp. 188-193.

Grosser, D. 1971. Beitrag zur histologie undklassifikation asiatischer Bambusarten. Mitt. BFH, Reinbek, 85: 1-321.

Grosser D. y Liese W. 1971. On the anatomy of Asian bamboo with especial reference to their vascular bundles. Wood Science and Technology, 5: 290 – 312.

Grosser D. y Liese W. 1973. Present status and problems of bamboo classification. J. Arnold Arboret, 54: 293 .308.

Heng, H.P., Yeho H.H., Tan C.K.C. &Rao A.N. 1996. Leaf isozyme polymorphisms in Bamboo species. Journal of the Singapore National Academy of Science. (22): 10-14.

Hidalgo, O. 1974. Bambú, su cultivo y aplicaciones en: fabricación de papel, construcción, arquitectura, ingeniería y artesanía. Estudios Técnicos Colombianos Ltda. 318 p.

Judziewicz, E., L.G. Clark, X. Londoño, & M. J. Stern. 1999. American Bamboos. Smithsonian Institution Press, Washington & London. 392 p.

Kelchner, S.A. & Clark, L.G. 1997 Molecular evolution and phylogenetic utility of the chloroplast rpl 16 intron in *Chusquea* and the Bambusoideae (Poaceae). *Molecular phylogenetics and Evolution*. (8): 385–397.

Kirkby, C. s.f. The distribution, abundance, clump characteristics and techniques for managing *Guadua* cf. *angustifolia*, Bambuseae, a potential non-wood forest product, in Madre de Dios, Peru. Amazon Conservation Association (ACA), Jr. Cusco 499, Puerto Maldonado, Madre de Dios, Peru. Tambopata Reserve Society (TreeS), PO Box 33153, London NW3 4DR, UK. [http://www.geocities.com/marona\\_mdd/](http://www.geocities.com/marona_mdd/)

Kobayashi, M. 1997. Phylogeny of woody bamboos analysed by restriction fragment length polymorphisms of chloroplast DNA. In: Chapman G.P. ed. *The bamboos*. Linnean Society Symposium Series. UK.: Linnean Society of London: 61-81.

Liese, W. 1993. Anatomía. In *Memorias I Congreso Mundial de Bambú/Guadua*. Pereira, Colombia, Agosto 8-15 1993, 25-29p. SENA, Santafé de Bogotá, Colombia.

Londoño, X. 1989. Una nueva variedad de *Guadua angustifolia* Kunth, de Colombia. *Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales*. 17(65): 379-381.

Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae: Bambusoideae). *Caldasia* 16 (77):139-153.

Londoño, X. 1998. A decade of observations of a *Guadua angustifolia* plantation in Colombia. *J. Amer. Bamboo Soc.* 12(1):37-43.

Londoño, X; Tamayo, GC; Riaño, NM; López, Y. 2002. Characterization of the anatomy of *G. angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) culms. *The Journal of the American Bamboo Society*. 16(1):18-31.

Londoño, X., Clark, L. G. 2002. Three new taxa of *Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) from South America. *Novon* 12: 64-76.

Londoño, X. & L.G. Clark, 2004. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del Nuevo Mundo. III Congreso Colombiano de Botánica, Popayán, 7 al 12 de Noviembre de 2004. Material inédito. [www.bambuguadua.org](http://www.bambuguadua.org)

Londoño, X. 2006. Estudio de caso: Cadena productiva nacional de la guadua *Guadua angustifolia* Kunth Poaceae: Bambusoideae. Tomo I 398-400 p. En Chaves, M.E. y Santamaría M. (eds.) 2006. Informe sobre el avance en el conocimiento y la información de la biodiversidad 1998-2004. Instituto de Investigaciones de recursos Biológicos Alexander von Humboldt. Bogotá, DC. Colombia. 2 Tomos.

Londoño, X. 2003. Ver Corporación Autónoma Regional del Quindío, CRQ. [http://www.crq.gov.co/visual\\_crq/centro\\_guadua.html](http://www.crq.gov.co/visual_crq/centro_guadua.html)

Marulanda, M. L., Márquez P. and X. Londoño. 2002. AFLP's analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) in Colombia with emphasis in the Coffee Region. Bamboo, Science & Culture. J. Amer. Bamboo Sc.16 (1): 32-42.

Marulanda M, López A, y Claro J. 2007. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp, In Colombia using rice and sugarcane microsatellites, In: Crop Breed and Applied Biotechnology, Brazilian Society of Plant Breeding, 7: 43-51.

Mejía, N. 2004. Acuerdo de Competitividad para la Cadena Productiva de la Guadua. Documento Soporte. Armenia, Colombia.

Montiel, M. 2004. Descripción morfológica ultraestructural comparativa de *Guadua angustifolia* kunth, *Guadua angustifolia* "forma cebolla", *Guadua angustifolia* "sur" y *Guadua angustifolia* (ex *chacoensis*). Universidad de Costa Rica, San José, Costa Rica. Informe: Project INCO-DC ICA4-CT2001-10091.

Muñoz, J. E., Londoño, X. 2011. Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero. Sexto informe Proyecto No. MADR2008M6336-3616. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Munro, W. 1868. A monograph of the Bambusaceae, including descriptions of all the species. Trans. Linn. Soc. London. 26:1-157.

Potosí et al. Potosí C.; Vallejo F, y Palacio J. 2006. Estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en *Guadua* en el departamento del Cauca, Colombia, Tesis de Maestría en Recursos Fitogenéticos Neotropicales, Universidad Nacional de Colombia Sede Palmira, 2006,

Rao, A.N. & V. R. Rao. 2000. Bamboo Conservation, Diversity, Ecogeography, Germplasm, Resource Utilization and Taxonomy. Proceeding of training course, 10-17 May 1998, Kuming and Xishuangbanna, Yunnan, China. Pp. 275. Recht, C; Wetterwald, MF. 1988. Bamboos. Ed. David Crampton. Timber Press, INC, Portland Oregon EEUU. 128p.

Riaño, N. M., Londoño, X., López, Y., Gómez, J. H. 2002. Plant growth and biomass distribution on *Guadua angustifolia* Kunth in relation to ageing in the Valle del Cauca – Colombia. Bamboo, Science & Culture. J. Amer. Bamboo Sc.16 (1):

43-51. Rodríguez Castillo, N.; Gómez, G. D.; Valencia, J. C.; Velásquez, C. y L. Burbano. 2009. Caracterización citogenética de cuatro variedades taxonómicas de *Guadua angustifolia* Kunth. Informe final proyecto de investigación N°480, Centro de estudios e investigación en Biodiversidad CIBUQ, Línea de Investigación en Biotecnología Vegetal, Programa: Biología, Facultad de Ciencias Básicas y Tecnologías, Universidad del Quindío, sistema integrado de gestión. Código: M.IN.03.02.04.F.02

Romero, M., Cabrera, E., Ortiz, N. 2008. Informe sobre el estado de la Biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 186 p. Acceso electrónico: [http://www.humboldt.org.co/download/Informe\\_Nacional\\_biodiversidad\\_1.pdf](http://www.humboldt.org.co/download/Informe_Nacional_biodiversidad_1.pdf)

Ruiz-Sánchez 2010. Delimitación de especies y posición filogenética del género de bambú americano *Otatea* (Poaceae: Bambusoideae). Tesis Doctoral, Instituto de

Ecología, A.C. Departamento de Biología Evolutiva, Xalapa, Veracruz, México. 187p.

Sanchis Gritsch, C; Murphy, R. 2004. Anatomical changes in *Guadua angustifolia* culms in relation to age, site, and physico-mechanical properties. Imperial College London. Informe: Project INCO-DC ICA4-CT2001-10091

Sekar, T. and Balasubramanian, A. 1994. Occurrence of a new vascular bundle type in bamboo. Bamboo Information Centre- India Bulletin, 4: 41 -42.

Soderstrom, T.R. & R.P. Ellis. 1987. The position of bamboo genera and allies in system of grass classification. En T.R. Soderstrom et al. (eds), Grass Systematics and Evolution, 225-238.

Smithsonian Institution Press, Washington, D.C. (Simposio Internacional sobre Sistemática y Evolución de las Gramíneas. Washington, D.C., 27-31 Jul. 1986.

Soderstrom, T.R., E.J. Judziewicz, & L.G. Clark. 1988. Distribution patterns of neotropical bamboos. Academia Brasileira de Ciencias. (Neotropical distribución: resúmenes del taller, Río de Janeiro, 12-16 enero 1987).

Soderstrom, T.R. & S. M. Young, 1983. How to collect bambos. Annals of Missouri Botanical Garden.

Stewart, J. 1999. Variación genética en árboles forrajeros. En: Congreso Latinoamericano de Agroforestería para la Producción Animal Sostenible. CIPAV Cali. ISBN 958-9386-22-9.

Valencia J., Rodríguez N. Herrera J. C. y G. Camacho. 2012. Caracterización morfológica del cariotipo de *Guadua angustifolia* Kunth Var. *Angustifolia*. (Bambusoide: Poaceae). 2012. Rev. Invest. Univ. Quindío. (Col.), 23(2): 17-23.

Villegas Marcelo. 1996. Bambusa Guadua, colección La cultura del café, Villegas Editores.

Villegas Marcelo. 2003, Guadua, Arquitectura y diseño. Villegas editores Bogotá Colombia 2001. ISBN 958-81 56 05 X.

Watanabe, M., ITO, M. & Kurita, S. 1994. Chloroplast DNA phylogeny of Asian Bamboos and its systematic implication. Journal of Plant Research (Japan).107(1087): 253 –261

Yang, Y.; Costa, A.; Leonhard N.; Siegel, R. S. and J. I Schroeder. 2008. Isolation of a strong *Arabidopsis* guard cell promoter and its potential as a research tool. Plant Methods, 4: 1-15.

Young, SM: Judd, WS. 1992. Systematics of the *Guadua angustifolia* complex (Poaceae: Bambusoideae). Annals of the Missouri Botanical Garden. 79(4):737-769.

Zhou, M., Lei, Z., Li, H., Yi, W., Zhang, Z., Guo, A. 2010. NMDA receptors-dependent plasticity in the phototaxis preference behavior induced by visual deprivation in young and adult flies. Genes Brain Behav. 9(3): 325--334.

## CAPÍTULO 2.

### Diversidad Morfológica de *Guadua angustifolia*

#### Resumen

El INCIVA, la Universidad Santiago de Cali- USC, la Unidad Central del Valle del Cauca- UCEVA y la Fundación para el desarrollo social del centro del Valle del Cauca- FUNCEVALLE, en el año 2006 presentaron, dentro de la estrategia de Bioregión, el proyecto “Banco de germoplasma de Bambusoideas del Jardín Botánico “Juan María Céspedes”, con la reintroducción de ecotipos caracterizados molecularmente, para la generación de investigación e innovación, que permita mayor valor agregado para el desarrollo social y empresarial, bajo criterios de sostenibilidad. La propuesta buscó investigar y garantizar las variedades de Guadua y Bambúes que permitan su utilización y transformación y con ello, generar nuevas actividades para fomentar el trabajo y el desarrollo social mediante el cuidado de los recursos naturales.

En el año 2007, se inició con recolección y enriquecimiento de las colecciones del Jardín Botánico del Valle del Cauca y la granja El Bijal en el corregimiento de la Iberia-Tuluá, la caracterización morfométrica, el análisis de ADN y capacitación empresarial en el área Administrativa y de Formulación de Proyectos, cultivo de la guadua, artesanías y construcciones.

El material colectado con los diferentes ecotipos de guadua existentes en el Valle del Cauca y áreas circunvecinas se ha sembrado en los bancos de germoplasma del Jardín Botánico de Tuluá y las granjas de la Iberia - El Bijal, Valle del Cauca, Colombia. Estos materiales han permitido evaluar los diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo de los ecotipos introducidos, establecer las condiciones abióticas y bióticas de desarrollo de esta especie y estimar la variabilidad fenotípica de los rodales parentales (fuentes semilleros).y de las colecciones existentes.



De los ecotipos de guadua colectados se caracterizaron morfológicamente 40 ecotipos de guadua y se hicieron ensayos de adaptabilidad con 20 de ellos. Se estimó el grado de correlación entre variables y análisis discriminante entre biotipos. A mayor altitud mayor dureza y menor grosor de la línea nodal. Por lo tanto, en programas futuros de mejoramiento estas características fenotípicas deben tenerse en cuenta para producir una guadua de calidad en las cadenas productivas.

A mayor longitud el entrenudo y mayor grosor de la línea nodal menor resistencia al ataque de bacterias. Esto podría significar que rodales con longitud entrenudos y grosor de la línea nodal mayores son más susceptibles al ataque de bacterias. Esto también debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar un plan de mejoramiento y manejo de la guadua en el Valle del Cauca.

Por último, con base en los análisis realizados, se caracterizaron los biotipos de *Guadua angustifolia* en el Valle del Cauca desde el punto de vista geográfico, ecológico y exomorfológico.

## 2.1. Introducción

El INCIVA, conjuntamente con la Universidad Santiago de Cali- USC, la Unidad Central del Valle del Cauca- UCEVA y la Fundación para el desarrollo social del centro del Valle del Cauca- FUNCEVALLE, en el año 2006 presentó, dentro de la estrategia de Bioregión, el proyecto “Banco de germoplasma de bambusoideas del Jardín Botánico “Juan María Céspedes”, con la reintroducción de ecotipos caracterizados molecularmente, para la generación de investigación e innovación, que permita mayor valor agregado para el desarrollo social y empresarial, bajo criterios de sostenibilidad. La propuesta buscó investigar y garantizar las variedades de Guadua y Bambúes que permitan su utilización y transformación y con ello generar nuevas actividades que puedan fomentar el trabajo y dar desarrollo social mediante el cuidado de los recursos naturales.

El proyecto se inició en el año 2007, adelantándose varias fases según el cronograma establecido y el compromiso de las instituciones participantes: recolección y enriquecimiento de las colecciones del Jardín Botánico del Valle del Cauca y la granja El Bijal en el corregimiento de la Iberia- Tuluá, caracterización morfológica, análisis de ADN y capacitación empresarial en el área Administrativa y de Formulación de Proyectos, cultivo de la guadua, artesanías y construcciones.

El material colectado con los diferentes ecotipos de guadua existentes en el Valle del Cauca y áreas circunvecinas se ha sembrado en los bancos de germoplasma del Jardín Botánico de Tuluá y las granjas de la Iberia - El Bijal, Valle del Cauca, Colombia. Estos materiales han permitido evaluar los diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo de los ecotipos introducidos y réplicas de las colecciones del Jardín Botánico y de la Iberia. Han permitido establecer las condiciones abióticas y bióticas de desarrollo de esta especie, estimar la variabilidad fenotípica de los rodales parentales (fuentes semilleros).y de las colecciones existentes. Con esta colección se ha estimulado un crecimiento importante de los conocimientos sobre el alcance y la distribución de la diversidad genética dentro de los biotipos para el

Valle del Cauca. Además, ésta colección se convierte en un marco de referencia para otros estudios.

La caracterización morfológica de cada uno de los ecotipos de guadua estudiados ha permitido estimar la diversidad fenotípica y establecer la estructura poblacional de los rodales de guadua, y que en asociación con estudios de tipo ecológico y silviculturales, adelantados simultáneamente, ha hecho posible la realización de planes de manejo, fomento, uso y conservación más eficientes, de modo que se pueda mantener la diversidad localmente almacenada, en los miles de años de evolución de esta especie. Este conocimiento ha apoyado a las comunidades, instituciones y empresas interesadas en generar estrategias efectivas de reforestación, recuperación, comercialización y manejo sostenible de la especie.

La realización de esta investigación fortaleció la colección del Jardín Botánico “JMC” y permitió el montaje de una nueva colección en la Granja El Bijal. De los ecotipos de guadua colectados se caracterizaron morfológicamente 40 ecotipos de guadua y se hicieron ensayos de adaptabilidad con 20 de ellos.

## **2.2. Materiales y Métodos**

### **2.2.1. Recolección de material.**

Se ha recolectado material en los departamentos del Valle del Cauca y Risaralda, con un total de veintinueve (29) sitios, los cuales se detallan en la tabla 2.1. El formulario empleado para la toma de registros de campo se puede analizar en el anexo A.

Tabla 2.1. Sitios de colecta georeferenciados de *Guadua angustifolia*.

ESPECIE	MUNICIPIO	DEPTO	LOCALIDAD	COORDENADAS		Altitud (m.s.n.m.)
				LAT.	LONG.	
<i>G. angustifolia</i>	El Cerrito	Valle	Finca Bellavista	03°38'54,2" N	76°12'17,3" W	1240
<i>G. angustifolia</i>	El Cerrito	Valle	Finca San Mateo	03°38'32,1" N	76°11'31,5" W	1372
<i>G. angustifolia</i>	Sevilla	Valle	Granja proagrocafe	04°17'05,6" N	75°54'09,2" W	1550
<i>G. angustifolia</i>	Sevilla	Valle	Vereda El Popal	04°15'03,4" N	75°56'20,8" W	1300
<i>G. angustifolia</i>	B/grande	Valle	Finca El Paraíso, cgto. Galicia.	04°13'54,3" N	76°02'19,0" W	1000
<i>G. angustifolia</i>	Pereira	Risaralda	Comfamiliar Risaralda	04°47'58,2" N	75°48'20,0" W	1180

Continuación de la tabla 2.1.

<i>G. angustifolia</i>	Santa Rosa	Risaralda	Finca Guayabito	04°53'32,6" N	75°37'28,2" W	1620
<i>G. angustifolia</i>	La Virginia	Risaralda	Ingenio Risaralda	04°53'09,7" N	75°54'45,6" W	930
<i>G. angustifolia</i>	La Virginia	Risaralda	Vereda Cañaveral	04°49'57,2" N	75°56'05,7" W	920
<i>G. angustifolia</i>	Barcelona	Quindío	Río Verde.			1200
<i>G. angustifolia</i>	Riofrío	Valle	Bocatoma de la EPSA	04°08'10,9" N	75°21'38,8" W	1132
<i>G. angustifolia</i>	Buga	Valle	PNR El Vínculo.	03°50'10,6" N	76°17'49,5" W	993
<i>G. angustifolia</i>	Tuluá	Valle	Granja de Tres Esquinas.	04°06'12,7" N	76°12'34,5" W	980

Continuación de la tabla 2.1.

<i>G. angustifolia</i>	Tuluá	Valle	Granja El Bijal.	04°03'42,0" N	76°06'24,3" W	1340
<i>G. angustifolia</i>	Tuluá	Valle	Quebrada la Zorrilla	04°03'37,1" N	76°06'13,4" W	1345
<i>G. angustifolia</i>	Jamundí	Valle	Urb. Alfaguara	03°15'16,3" N	76°33'17,7" W	995
<i>G. angustifolia</i>	Jamundí	Valle	Urb. Alfaguara-	03°15'10,4" N	76°33'18,5" W	990
<i>G. angustifolia</i>	Jamundí	Valle	Puente sobre el río Jamundí.	03°17'7,0" N	76°32'57,4" W	999
<i>G. angustifolia</i>	Jamundí	Valle	A orillas del río Anchipayá-	03°14'54,9" N	76°34'58,2" W	1020
<i>G. angustifolia</i>	Jamundí	Valle	Club campestre Carvajal	03°13'52,4" N	76°33'51,4" W	1013

Continuación de la tabla 2.1.

<i>G. angustifolia</i>	Cali	Valle	Río Jamundí	03°17'10,6" N	76°31'31,4" W	1007
<i>G. angustifolia</i>	La Tebaida	Quindío	Vereda El Huerto-	04°25'07,7" N	75°51'43,4" W	1150
<i>G. angustifolia</i>	Quimbaya	Quindío	Finca Maracaibo	04°38'01,9" N	75°46'28,7" W	1277
<i>G. angustifolia</i>	Alcalá	Valle	Finca El Prado,	04°40'54,2" N	75°48'21,9" W	1232
<i>G. angustifolia</i> <i>Var. bicolor</i>	Tuluá	Valle	Q. La Frisolina,	04°00'47,9" N	76°09'26,3" W	1128
<i>G. angustifolia</i>	Restrepo	Valle	Vereda San Pablo.	03°49'03,1" N	76°31'33,9" W	1401
<i>G. angustifolia</i> <i>Var. bicolor</i>	Vijes	Valle	Vereda La Merced	03°48'07,1" N	76°28'28,1" W	1446

Continuación de la tabla 2.1.

<i>G. angustifolia</i>	Restrepo	Valle	Urbanización Luz Marina	03°48'58,8" N	76°32'20,0" W	1447
<i>G. angustifolia</i> <i>Var. bicolor</i>	Buga	Valle	PNR El Vínculo.	03°50'14,0" N	76°17'57,6" W	988

Como complemento al trabajo de campo, se realizaron estudios de suelos de dos sitios donde se establecieron las colecciones (Jardín Botánico en el corregimiento de Mateguadua y la Granja El Bijal en el corregimiento de la Iberia). Igualmente, se tomaron muestras de cada uno de los predios donde se recolectaron las quince accesiones de guadua (Figura 2.1.).



Figura 2.1. Extracción de rizomas de guadua.

Aunque es poca la información la que se tiene sobre suelo debido a que solamente se posee 9 análisis de laboratorio de los 31 solicitados (29 localidades colectadas y 2 colecciones), se puede tener algunos datos preliminares, tales como:



- El Ph en general es neutro o ligeramente ácido y se encuentra entre 5.4 y 6.8, concordando los sitios de Ph más bajo (fuertemente ácido) con el encharcamiento de sus suelos, como son los caso de Santa Rosa de Cabal y La granja El Bijal en el municipio de Tuluá.
- Donde se encuentran los rodales la guadua, el contenido de materia orgánica es alto.
- Se observa relación con algunos elementos.
- El Fósforo y el Sodio son muy pobres
- El Calcio, potasio, boro, hierro y cobre son elementos importantes en el desarrollo de la guadua, con altos contenidos de estos elementos.
- Otros elementos como el azufre en su contenido es muy variable. Algunos guaduales presenta altos contenidos y otros poco.
- La textura de los suelos son generalmente franco o franco arenoso o franco arcilloso.

### **2.2.2. Registro morfométrico.**

Se caracterizó cada uno de los individuos de guadua colectados, tomándose los registros en los culmos representativos de cada mata. Igualmente, se tomaron los registros morfométricos de los ecotipos de guaduas existente en la colección del Jardín Botánico y del material leñoso del herbario de Tuluá. Se evaluaron los siguientes parámetros: altura y diámetro del culmo, longitud del entrenudo, grosor de la pared del culmo y ancho de la línea nodal.

### **2.2.3. Evaluación de crecimiento y desarrollo**

Se viene realizando la evaluación de crecimiento de cada uno de los individuos sembrados tanto en Mateguadua como en la Iberia. A continuación se relaciona el desarrollo de los rebrotes emergidos. El formulario utilizado para la toma de los respectivos registros se detalla en el anexo B.

Los rebrotes emergieron en los primeros 30 días después de la siembra. Durante los primeros 30 días su crecimiento alcanzó tasas de 4 – 6 cm por día, especialmente en horas de la noche. Después de los 90 cm. el renuevo estabiliza su crecimiento en un promedio de 9 – 11 cm por día (figura 2.a) Los renuevos durante los primeros 6 meses se encuentran revestidos completamente de hojas caulinares que varían según el sitio y las condiciones climáticas donde se desarrollaron (figura 2.2.b).

Cada retoño que crece de la tierra, ya contiene todos los nudos, entrenudos y los diafragmas que se encuentran comprimidos en su primera fase de desarrollo. Los tallos de la guadua son huecos y tienen una sección transversal circular. Con el aumento de su altura adelgazan en diámetro y en el grosor de su pared (Londoño 1992).

La siguiente fase de crecimiento se inició después de los 6 meses cuando las hojas caulinares de la parte apical del culmo comienzan a desprenderse, dando paso a las ramas primarias y consecutivamente a las secundarias. A esta fase se le denomina Guadua Joven ó viche. Esta etapa va desde los 6 meses hasta los 3 años de edad. En esta edad, la guadua tiene poca dureza porque carece de lignificación completa y se reconoce porque posee un color verde intenso y lustroso, su superficie es limpia de musgo y nudos con bandas nodales de color blanquecino, donde además se encuentran las yemas (figura 2.2.c).

En los primeros seis o siete meses de vida, la *Guadua Angustifolia* alcanza su altura final de 20 a 30 metros y un diámetro de hasta 18 centímetros. A partir del séptimo mes crecen las ramas tamizadas, que se encuentran en forma de espina en su parte inferior y en su parte superior mostrando las hojas. En su comienzo, el tallo se envuelve en una cáscara peluda para su protección, que se cae después de los dos años.

La planta con el transcurrir del tiempo origina cada vez nuevos rebrotes que van evolucionando en diámetro y altura a tal punto que dependiendo del tipo de suelo y de las condiciones climáticas logra entre 10 y 13 cm de altura en 30 días y diámetros que se incrementan a un promedio de 0.10 mm mensuales; al finalizar el primer año tiene un promedio de 12-14 rebrotes con vida productiva de 3-4 meses al cabo de los cuales se secan de arriba hacia abajo para dar paso a nuevos rebrotes con que adquieren mayor altura y salen con diámetro mayores. En condiciones normales en las primeras fases de desarrollo, siempre los nuevos hijos (renuevos) poseen mayor tamaño de rizoma, diámetro y altura, con relación a la planta que los generó. A partir del tercer año de sembrada la planta original, se logra tener entre 18-20 rebrotes, alturas que oscilan entre los 5 y 7 metros y diámetros de 4-6 cm; época en la cual se deben realizar los primeros tratamientos silviculturales para evitar el exceso de tallos.

Entre los 3 y 6 años de edad, en esta fase la guadua alcanza su mayor resistencia y dureza. A esta fase se le conoce como guadua madura o sazónada. En esta fase alcanza su mayor resistencia y dureza y se caracteriza por la desaparición en el tallo del lustre en el entrenudo, color verde oscuro y la aparición de manchas de hongos color gris-claro, de forma redonda a oblonga, con diámetros hasta de 3 cm en la superficie (figura 2.2.d). Un tallo de edad entre los 3 y los 5 años se reconoce porque tiene ausencia de hoja caulinar, hay presencia de follaje y sobre el tallo hay presencia de manchas de algas en buena cantidad. (Martínez Cáceres, D. E. 1992).

*Guadua sobremadura:* De los 6 años en adelante, esta es una guadua que no fue aprovechada en su momento, deja de ser productiva y tiende a rajarse muy fácilmente, no resiste ni siquiera los clavos, ni golpes muy fuertes con el martillo, se reconoce porque pierde el color verde oscuro de la guadua madura y en cambio toma un color naranja y no hay presencia de follaje lo cual indica que es fisiológicamente inactiva (figura 2.2.).

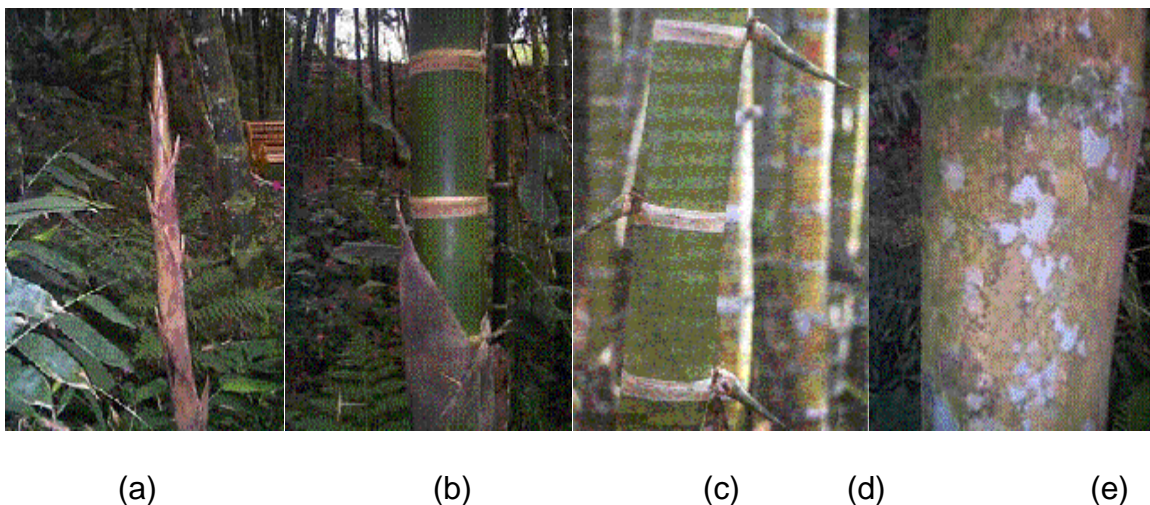


Figura 2.2. Estados de desarrollo vegetativo del culmo de guadua: a) renuevo, b) renuevo de edad avanzada, c) guadua joven, d) guadua sobremadura, e) guadua seca. (Fotos de D. Morales; Giraldo y Sabogal 1999).

#### 2.2.4 Análisis morfométrico en *Guadua angustifolia* Kunth del Departamento del Valle del Cauca.

Este análisis tuvo como objetivo principal la estimación de la diversidad morfológica de *Guadua angustifolia* KUNTH del departamento valle del cauca, mediante análisis morfométricos. Se estimó el grado de correlación entre variables y análisis discriminante entre biotipos. Por último, con base en los análisis realizados, se caracterizaron los biotipos de *Guadua angustifolia* en el Valle del Cauca desde el punto de vista geográfico, ecológico y exomorfológico. El material colectado en cada una de las salidas, se ha distribuido en los dos sitios seleccionados para establecer la colección de guaduas, bajo la responsabilidad de los funcionarios de estos centros: INCIVA para el caso del Jardín Botánico y la UCEVA, para la granja el Bijal.

El guadua es un ecosistema estratégico y clave para la subsistencia de las comunidades que habitan en el territorio del departamento del Valle del Cauca, es por esto que los resultados de este proyecto, pueden ser aprovechados por las comunidades y entidades interesadas en promover estrategias de uso sostenible y conservación del recurso. El género *Guadua* incluye aproximadamente 30 especies que se distribuyen desde México por todos los países de Centroamérica y Sudamérica hasta Argentina con excepción de Chile. En Centroamérica están las especies *G. aculeata*, *G. amplexifolia*, *G. maclurie* y *G. velutina*; en Sudamérica algunas de las especies son: *G. latifolia*, *G. amplexifolia*, *G. weberbaueri*, *G. capitata*, *G. calderoniana*, *G. ciliata*, *G. paniculata*, *G. superba*, *G. Tagoara*, *G. Trinii*, *G. Paraguayana* y *G. angustifolia* que predomina en la región andina de Colombia y Ecuador.

### 2.2.5 Especies colombianas:

El género *Guadua* se distribuye desde México por todos los países de Centroamérica y Sudamérica hasta Argentina con excepción de Chile. En Colombia se han registrado seis, ellas son:

<i>Guadua angustifolia</i> :	Predomina en la región andina de Colombia y Ecuador.
<i>G. amplexifolia</i> :	Crece en el norte de Colombia y Venezuela.
<i>G. glomerata</i> :	Se ha encontrado en Colombia, Brasil, Venezuela y Perú.
<i>G. paniculata</i> :	Está en Colombia, Oeste de México, Venezuela y Brasil.
<i>G. superba</i> :	Desde las amazonias colombiana y venezolana hasta Surinam, Perú y <i>Bolivia</i> .
<i>G. macrospiculata</i> :	Amazonía de Colombia, Brasil y Perú

**Los biotipos:** En la guadua hay variaciones morfológicas que han dado origen a los nombres empíricos de macana, cebolla y castilla, a estos nombres es lo que se denomina biotipo. Por Biotipo según Font Quer (1965) se entiende grupo de individuos con el mismo patrimonio hereditario homocigótico o conjunto de fenotipos correspondientes al mismo genotipo o sinónimo de forma biológica y tipo biológico.

*La Guadua angustifolia* cuenta con cuatro biotipos denominados Cebolla, Macana, Rayada y Castilla. Los biotipos se han diferenciado de acuerdo con características morfológicas externas, costumbres campesinas, terminología vernácula, propiedades físico - mecánicas y condiciones propias de desarrollo de la planta.

El **biotipo Macana** se distingue por tener culmos delgados y madera dura, ideal para construcción; se conoce popularmente con el nombre de guadua macho, posee abundantes ramas inferiores espinosas llamados ganchos, entrecruzados en tal forma que hace difícil la entrada al guadua.

El **biotipo Cebolla** se reconoce por sus gruesos tallos y madera blanda, por ello se utiliza frecuentemente en la elaboración de esterilla.

El **biotipo Castilla** se diferencia de las anteriores por tener paredes más delgadas y alcanza el mayor diámetro, tiene pocas ramas bajas con espinas, se caracteriza por su poca resistencia, se usa para hacer esterilla, en el Tolima se llama **guadua balsa o hembra**.

El **biotipo Rayado** se caracteriza por tener rayas amarillas en el tallo y por tener la menor resistencia.

#### **2.2.6. Variedades de *Guadua angustifolia*:**

***G. angustifolia* var. *angustifolia*:** De acuerdo con el estudio de Gómez et al. (2000) esta variedad quedó conformada por los biotipos denominados Macana y Cebolla. Se distribuye en el norte de Sudamérica y en Colombia en los pisos cálido y templado, en el Quindío entre los 995 y 1850 m. También crece en Risaralda, Caldas, Antioquia y Valle del Cauca. Se usa principalmente en el sector de la construcción, debido a su resistencia atribuida al grosor de sus paredes, por presentar un buen comportamiento como columnas y para la obtención de esterilla.

***G. angustifolia* var. *bicolor*:** Está basada en el biotipo llamado Rayada Amarilla. Según Londoño (1989) se encuentra en la cordillera occidental en los Departamentos de Cauca, Risaralda y Valle, en menor frecuencia en la Cordillera

oriental y en la cordillera Central en los Departamentos de Quindío, Tolima y Valle. Sus culmos se usan en construcciones, posee gran potencial ornamental.

***G. angustifolia* var. *nigra*:** Está basada en el biotipo llamado Rayada Negra. En la actualidad esta variedad se localiza únicamente en dos lugares del departamento del Quindío, Hacienda Nápoles ubicada en el Municipio de Montenegro a 1058 m de altitud y en el Centro Nacional para el Estudio del Bambú-Guadua, en el Municipio de Córdoba, forma parte del banco de germoplasma que allí se tiene, fue transferida desde la Hacienda Nápoles. Esta variedad no ofrece buena resistencia para la construcción y por eso es aprovechada solo para la fabricación de muebles y artesanías, además posee potencial ornamental.

***G. angustifolia* var. *grandicaula*:** Está basada en el biotipo comúnmente conocido como castilla o guadua macho. Esta variedad se encuentra entre los 1100 y 1425 m en el Departamento del Quindío, en los municipios de Génova, La Tebaida, Montenegro, Quimbaya y Circasia. También puede encontrarse en los Departamentos de Risaralda, Caldas y Valle del Cauca. Se emplea para la obtención de esterilla y como columnas en el campo de la construcción, además para la elaboración de artesanías (guitarras, jarrones, tambores entre otras). Posee las paredes del culmo más gruesas entre las 24 especies de Guadua que se reconocen en el mundo, así como las hojas caulinares de mayor longitud. Se le asignó el nombre de *grandicaula* en referencia al gran diámetro y longitud del culmo.

A nivel de variedades la ***nigra*** anatómicamente no presenta diferencias significativas con respecto a ***var. angustifolia*** y ***var. bicolor***, en cuanto a su morfología, el único carácter que permite diferenciarla es la presencia de rayas longitudinales verdes y negras en el culmo en algunas ramas y en ocasiones en hojas. Además, la ***var. nigra*** tiene un rango de distribución altitudinal muy restringido comparado con ***var. angustifolia*** y ***var. bicolor***. La variedad ***grandicaula*** se diferencia de la ***var. nigra*** por no presentar variegación en su culmo y de la ***var. angustifolia*** por tener diámetro, longitud y hojas caulinares de mayor tamaño (Gómez et al. 2004).

Respecto a la ecología su mayor grado de desarrollo se da bajo condiciones mesofíticas en alturas que no exceden los 1.500 m. La temperatura parece ser el factor limitante en su distribución latitudinal y altitudinal; no resiste periodos prolongados por debajo de 0°C y no crece bien en áreas donde la precipitación es menor de 1.200 milímetros anuales (Mc Clure, 1973). Temperaturas por debajo de 11°C con duraciones mayores de 6 horas diarias, son un limitante para su desarrollo (Londoño, 1990).

*Guadua angustifolia* presenta el más amplio rango de distribución, se extiende por las tres cordilleras, desde el norte hasta el sur a alturas entre 500 - 1.500 m (-1800 m), predominando en los valles interandinos donde forma grandes sociedades llamadas "Guaduales".

Los datos fueron tomados de las accesiones del Banco de Germoplasma de Bambusoideae que está localizado en el corregimiento de Mateguadua, Municipio de Tuluá (Valle del Cauca), aproximadamente a 800 metros de distancia de la sede administrativa del Jardín Botánico Juan María Céspedes de propiedad del Instituto para la Investigación y Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca (INCIVA). Tiene una extensión aproximada de 2 500 m<sup>2</sup>, presenta condiciones climáticas propias de bosque seco tropical con una ubicación altitudinal entre 950 a 1 100 metros.

#### **2.2.7. Enriquecimiento de banco de germoplasma**

El material colectado en cada una de las salidas, se ha distribuido en los dos sitios seleccionados para establecer la colección de guaduas, bajo la responsabilidad de los funcionarios de estos centros: INCIVA para el caso del Jardín Botánico y la UCEVA, para la granja el Bijal.

### **2.3. Resultados**

En la tabla 2.2 se indica el número de individuos muestreados por biotipo de la especie *Guadua angustifolia* en el Departamento del Valle del Cauca. En este



muestreo se puede observar que el biotipo cebolla fue el más frecuente, 60% aproximadamente.

Tabla 2.2. Frecuencias absolutas y relativas (%) de los cuatro biotipos de *Guadua angustifolia* y de dos especies estudiadas de este género en el Valle del Cauca.

Especie - Variedad (Var.)	Categorías	Frecuencias	%
G. angustifolia Var. <i>Castilla</i>	1	4	5,48
G. angustifolia Var. <i>Cebolla</i>	2	44	60,27
G. angustifolia Var. <i>Macana</i>	3	13	17,81
G. uncinata	4	2	2,74
<i>Guadua amplexifolia</i>	5	3	4,11
<i>Guadua glauca</i>	6	2	2,74
G. angustifolia Var. <i>Bicolor</i>	7	5	6,85
Total		73	100,00

La tabla 2.3 muestra algunas características de los sitios de muestreo como altitud (m.s.n.m.), textura, pH y Materia orgánica (%) del suelo y relieve.

Tabla 2.3. Características de las áreas de estudio. Donde M: O significa contenido de materia orgánica del suelo.

<b>Colección</b>	<b>Localidad</b>	<b>Altitud (m.s.n.m.)</b>	<b>Textura</b>	<b>Relieve</b>	<b>pH (1:2,5)</b>	<b>M.O (%)</b>
Col Botánico	Mateguadua (Tuluá)	1100	F-Ar-A		6,2	3,40
Col El Bijal	La Iberia (Tuluá)	1345	F-A		5,4	6,50
JA 1035	La Honda (El Cerrito)	1.240	F-A	Ondulado	6,2	3,30
JA 1036	El Pomo (El Cerrito)	1.372	F-Ar-A	Ondulado	6	7,30
JA 1038	Granja La Sirena (Sevilla)	1.550	F	Ondulado	6,5	7,03
JA 1039	El Popal (Sevilla)	1.300	F-Ar	Ondulado	6,6	5,27
JA 1040	Paila arriba (B/grande)	1.000	F-Ar	Plano ondulado	6,3	8,09
JA 1041	Comfamiliar (Pereira)	1.180	F	Ondulado	6,8	7,40
JA 1042	Guayabito (Santa Rosa)	1.620	F-A	Plano	5,5	8,16
JA 1043	Ing. Risaralda (La Virginia )	930	F-A	Plano	6,1	6,27
JA 1044	Cañaveral (La Virginia)	920	F-Ar	Plano	6,1	5,20
JA 1045	Hda Jamaica (Barcelona)	1.200	Ar	plano	5,8	3,14
JA 1046	Salónica (Riofrío)	1.132	Ar-A	Plano		
JA 1047	El Vínculo (Buga)	993	Ar	ligeramente plano		
JA 1048	Tres Esquinas (Tuluá)	980	F-A	Plano		
JA 1049	La Iberia (Tuluá)	1.340	Ar-A	inclinado		
JA 1050	La Iberia (Tuluá)	1.345	Ar	ligeramente plano		

### 2.3.1. Registro morfométrico.

Se caracterizó cada uno de los individuos de guadua colectados, tomándose los registros en los culmos representativos de cada planta. Igualmente, se tomaron los registros morfométricos de los ecotipos de guaguas existente en la colección del Jardín Botánico y del material leñoso del herbario Tuluá. El resultado de cada uno de los registros de los culmos representativos de cada planta se puede ver en la tabla 4. En esta tabla se relaciona los 66 individuos sembrados correspondientes a veintinueve ecotipos, distribuidos en las dos colecciones. En la tabla 5 se indica la caracterización morfométrica de la colección de guadua del Jardín Botánico de Tuluá. Igualmente, las figuras 2 y 3 muestran algunas partes que se evaluaron: diámetro, línea nodal, entrenudo y hoja caulinar y en la figura 4, algunos de las formas y variedades evaluadas.

Tabla 2.4. Relación del material sembrado en la localidad El Bijal.

ECOTIPO	LUGAR		TOTAL	ECOTIPO	LUGAR		TOTAL
	JARDIN BOTÁNICO	EL BIJAL			JARDIN BOTÁNICO	EL BIJAL	
JA- 1035	3	2	5	JA- 1052-1	1	0	1
JA- 1036	1	1	2	JA- 1053-1	1	0	1
JA- 1038	2	2	4	JA- 1054-1	1	0	1
JA- 1039	2	2	4	JA- 1055	1	0	1
JA- 1040	3	1	4	JA- 1056	1	0	1
JA- 1041	2	2	4	JA- 1057-1	0	1	1
JA- 1042	2	2	4	JA- 1057-2	1	0	1
JA- 1043	1		1	JA- 1058	1	0	1
JA- 1044	2	1	3	JA- 1059-1	0	1	1
JA- 1045	2	1	3	JA- 1059-2	1	0	1
JA- 1046	3	2	5	JA- 1060	0	1	1
JA- 1047	2	1	3	JA- 1061	1	0	1
JA- 1048	1	0	1	JA- 1062-1	0	1	1
JA- 1049	1	0	1	JA- 1062-2	1	0	1
JA- 1050	1	0	1	JA- 1063*	3	1	4
JA- 1051-1	0	1	1	JA- 1064	0	1	1
JA- 1051-2	1	0	1				
<b>TOTAL</b>					<b>42</b>	<b>24</b>	<b>66</b>

### 2.3.2. Variables de interés relacionadas con el aprovechamiento de la parte útil de la Guadua.

El Culmo y el entrenudo presentaron valores muy altos y bajos. La variable altura total del culmo confirma la existencia de guaduales con culmos hasta de 30 metros de longitud y de culmos cortos de 3 metros. El valor de los diámetros tomados a 1,30 m del suelo, evidenciaron la existencia de poblaciones de guadua con entrenudos muy gruesos (17,80 cm.) y otras con culmos muy delgados (1,975 cm.). La longitud del entrenudo mostró un valor máximo de 37,5 cm. (muy espaciado) y mínimo de 12,1 cm. para un promedio de 19,986 cm. (Figuras 2.3 y 2.4).



Figura 2.3. Evaluación morfométrica de *Guadua angustifolia*.



Figura 2.4 Variedades y formas de *Guadua angustifolia*

Los valores promedios de las variables cuantitativas dan una idea general de cómo son las poblaciones de guadua en el Valle del Cauca. En cuanto a la altura de culmos las poblaciones tienen un promedio de 16,8 m., los entrenudos de 20,9 cm., con un diámetro de 9.57 cm. (Tablas 2.5 y 2.6).



Tabla 2.5. Caracterización morfométrica de los ecotipos de *Guadua angustifolia* colectados en el año 2007 (Colección viva del Jardín Botánico José María Céspedes- Tulúa, Valle).

COLECCIÓN VIVA DE GUADUA DEL JARDÍN BOTÁNICO											
Colección	Forma	Altitud	Altura culmo	DAP	Long. Entrenudo	Grosor pared	Grosor línea nodal	Hoja caulinar (cm) (B x h)	Lamina foliar (cm) (A x L)	Dureza	Resistencia Bacteria
XL 076	Cebolla	1191	18	8,3	34,3	1,8	2,5	34,9 x 24,2	2,1 x 11,3	73,0	73,3
XL 091	Cebolla		17	7,4	18,5	1,8	2,0	26,5 x 26,5	2,7 x 9,5		23,0
XL 109		500	8	3,1	34,0	1,6	2,1	12,3 x 38,5	2,7 x 18	70,0	
XL 115	Cebolla		23	10,6	20,0	2,1	2,2	37,5 x 32,2	2,1 x 20,2		
XL 144		450	10	9,0	37,5	2,0	3,1	38 x 25,3	2 x 12,1	70,0	
XL 206	Cebolla	250	16	7,3	24,3	2,2	2,2	22,5 x 20,5	2,1 x 13,2	75,3	
XL 208			5	2,0	34,3	0,98	1,8	6,3 x 14,05	2,3 x 12		
XL 214		595	17	8,4	36,5	2,8	3,2	39 x 38,2	1,8 x 14	71,0	
XL 233	Macana	1181	18	11,0	21,8	2,5	2,7	35,8 x 33	1,9 x 14,2	69,5	37,5
XL 235	Cebolla	1181	14	6,8	24,5	1,4	1,8	31 x 27	1,3 x 12,8	72,0	25,0
XL 281	Cebolla	450	18	6,8	17,2	1,4	2,1	33,2 x 27,2	1,5 x 11,6	69,5	90,0
XL 282			4	1,2	29,6	0,3	1,0	6,1 x 23,2	1,9 x 24,8		
XL 289	Cebolla	450	18	10,3	17,4	2,0	1,8	44 x 56	1,6 x 15	75,3	36,8
XL 291	Macana	450	23	12,6	17,7	2,8	2,3	60 x 41,5	3 x 15	71,8	45,4
XL 303	Macana	450	18	11,0	16,6	2,4	2,4	51 x 27	1,2 x 9,5	69,8	60,0
XL 343	Macana	1625	22	11,6	17,5	2,2	2,2	51,6 x 27,5	2,5 x 13,1	73,3	
XL 344	Macana	1491	25	10,1	17,6	2,8	1,9	31,2 x 30	1,9 x 13	71,3	-
XL 345	Cebolla	1125	18	10,5	18,6	2,2	2,2	37 x 62	1,2 x 15,6	73,2	37,5
XL 366	Cebolla	1580	25	11,9	21,0	1,6	2,1	47x37,5	2x14,8	72,0	27,2
XL 375	Cebolla	1167	3	2,5	20,5	1,0	1,4		1,5x11,0	75,8	
XL 392	Cebolla	1969	16	7,8	20,9	1,4	1,5	33,0x32,0	2,0x12,0	75,0	83,3
XL 395	Cebolla		10	6,0	16,2	1,6	1,8	26,1 x 23,2	1,4 x 16,7		
XL 397	Cebolla		8	4,8	18,0	1,8	2,0	24,5x27,0	1,0x13,0	71,5	
XL 399	Cebolla	2125	15	5,7	19,3	1,4	1,4	34,0x34,5	1,5x15,5	71,5	50,0
XL 413	Cebolla	85	14	7,5	24,2	1,5	1,8	21,5x45,0	1,5x10,8	72,0	21,0
XL 416	Cebolla	1600	10	8,0	19,0	1,5	2,0		2 x 15,8	74,0	
XL 418	Cebolla	1358	12	7,2	17,3	1,3	1,8	16,0x18,8	1,9x15,1	74,8	
XL 542		96	7	3,6	16,2	1,3	1,7	16,0x32,1	1,0x17,5	80,0	
JA 1003		18	12	7,6	22,8	compacta	2,7	26,5x51,0	2,1x18,0	69,5	
JA 1004			8	4,8	12,1	compacta	1,5	50,3x27,5	2,0x12,1		
JA 1006			8	4,8	21,5	compacta	1,2	37,2x35,2	1,1x12,4	75,3	
JA 1012	Cebolla	1335	12	8,1	21,0	1,8	1,9	28,0x24,0	1,8x13,1	73,5	
JA 1013	Cebolla	1335	16	8,1	16,7	1,7	2,2	31,2x32,3	2,2x17,4	70,5	16,6
JA 1016	Cebolla	1300	16	8,1	18,3	1,9	2,0	35,0x20,8	1,6x13,0	71,8	-
JA 1019	Cebolla	66	14	8,0	19,1	1,5	1,7	24,5x19,0	1,5x11,5	72,0	25,0
JA 1020	Cebolla		14	7,5	17,8	1,6	1,4	20,0x20,5	1,8x14,0		60,0
JA 1023	Cebolla		20	9,9	25,2	1,8	2,4	20,5x22,0	1,6x11,5		
JA 1026	Macana	390	18	8,7	30,0	3,0	2,7	18,8x31,0	2,0x13,2	76,3	
JA 1027	Cebolla	1303	17	10,2	21,2	1,9	1,8	50,0x46,1	2,4x17,5	75,5	-
JA 1028	Cebolla	992	17	12,3	23,1	2,8	3,0	42,6x35,3	1,5x12,8	74,0	6,2
JA 1029	Cebolla	2120	24	5,5	19,0	1,0	1,8	58,0x45,5	2,3x16,0	76,0	-
JA 1031	Cebolla	1460	18	7,6	28,0	1,9	2,6	30,2x32,7	2,0x13,8	72,3	
JA 1032	Cebolla	980	20	10,2	17,3	2,2	2,0	37,0x40,5	1,7x14,0		59,2
JA 1033	var.bicolor	1100	15	9,9	19,5	1,9	1,9	40,0x30,0	1,8x16,2	71,8	

Tabla 2.6. Caracterización morfométrica de los ecotipos colectados en el año 2007 (Especímenes del Herbario, Jardín Botánico José María Céspedes- Tuluá, Valle).

COLECCIÓN 2007									
Colección	Forma	Altitud	Altura culmo	DAP	Long. Entrenudo	Grosor pared	Grosor línea nodal	Hoja caulinar	Lamina foliar
JA 1035	Castilla	1240	18	14,6	17	2,9	3	—	—
JA 1036	Castilla	1372	18	17,8	18,2	2,9	3,3	—	—
JA 1038	Macana	1550	15	14	19	3,3	2,7	—	—
JA 1039	Cebolla	1300	30	13,4	22	1,8	1,3	—	—
JA 1040	Cebolla	1000	10	10,2	21	1,7	1	—	—
JA 1041	Macana	1180	20	9,6	15	3	1,3	—	—
JA 1042	Cebolla	1620	20	10,2	20	2	2	—	—
JA 1043	Cebolla	930	25	9,9	17	2,3	2	—	—
JA 1044	Cebolla	920	25	9,2	18	1,3	1,5	—	—
JA 1045	Castilla	1200	28	16,1	21,2	3,1	3,1	—	—
JA 1046	Macana	1132	28	10,2	14,5	3,1	2,6	—	—
JA 1047	Macana	993	25	13,4	23,3	3,5	3,4	—	—
JA 1048	Macana	980	25	12,4	15,6	2,5	2,5	—	—
JA 1049	Cebolla	1340	13	9,7	21,1	2,2	2	—	—
JA 1050	Cebolla	1345	13	7,6	17,3	1,9	1,9	—	—
JA 1051-	Cebolla	995	18	12	21,2	2,7	3	57,2 x 58,6	2 x 17,6
JA 1051-	Macana	995	18	13,9	20,4	2,5	2,6	52,0 x 58,8	1,8 x 16,0
JA 1052	Macana	990	23	14,2	24,2	3	2,9	62,0 x 43,5	2,3 x 19,0
JA 1053	Cebolla	999	9	8,2	18,1	1,4	2,3	34,5 x 52,7	1,1 x 13,1
JA 1054	Cebolla	1020	15	12,5	15,2	2,4	3,1	48,6 x 59,2	1,8 x 18,0
JA 1055	Cebolla	1013	18	11,1	19,1	1,5	2,2	60,8 x 41,5	1,5 x 19,0
JA 1056	Cebolla	1007	15	11,9	19,3	2,2	2,7	48,8 x 35,3	2,4 x 17,5
JA 1057	Cebolla	1150	22	11,5	20	2	2,5	35,5 x 63,5	1,8 x 16,8
JA 1058	Castilla	1277	25	15,6	27,3	2,8	2,7	72 x 50,5	2 x 13,1
JA 1059-	Cebolla	1232	17	10	15	2,4	2,4	52,3 x 55,5	1,6 x 13,8
JA 1059-	Cebolla	1232	13	8,9	33,2	1,4	2,8	—	—
JA 1060	var.bicol	1128	20	12,4	13,8	2,8	2,5	37,2 x 52,5	1,5 x 16,7
JA 1061	Cebolla	1401	18	10,5	26,1	2	2,5	48,0 x 69,0	1,7 x 14,8
JA 1062-	var.bicol	1446	14	11,7	20,8	2	2,3	48,0 x 37,6	2,2 x 17,5
JA 1062-	var.bicol	1446	10	5,8	16,5	1,5	1,6	39,0 x 69,0	1,6 x 14,6
JA 1063	Cotuda	1447	23	16,1	26	2,6	3,1	42,0 x 59,0	1,5 x 13,1
JA 1064	var.bicol	988	12	10,8	18,6	2	2	40,5 x 55,1	1,7 x 14,6

Los coeficientes de variación (CV) más bajos (<20%) se observaron en las variables: longitud y ancho de la lámina foliar y dureza en la colección viva y longitud entrenudo y Grosor de la línea nodal en especímenes de herbario. Estas, posiblemente, no son útiles para discriminar un biotipo de otro. El resto de las variables estudiadas mostraron coeficientes de variación CV más altos (> 20%) sugiriendo alta variabilidad en los datos, lo que refleja la dinámica de las poblaciones y la distribución de rodales en la Bioregión (Tabla 2.7). En la tabla 2.7 se indican las estadísticas descriptivas de las variables analizadas en los cuatro biotipos (Castilla, Cebolla, Macana y Bicolor) de la especie *Guadua angustifolia* en el Departamento del Valle del Cauca. Se observa en los descriptores cuantitativos de las 73 muestras un amplio rango de valores.

### **2.3.3. Estadística Inferencial**

#### **2.3.3.1. Matriz de Correlación**

Al evaluar las componentes climáticas, en este estudio no se consideró la temperatura porque en el estudio de Castaño (2002b) se presentó una alta correlación entre la altitud y la temperatura por lo que la variación de esta última variable es explicada casi en su totalidad por la primera. Este hecho llevó a eliminar la temperatura del análisis. En este estudio fue muy clara la relación entre la temperatura de un sitio y su altitud y dicha relación se comportó de una manera inversa en una proporción estimada para la zona de 100 m /0.67 °C.

La Tabla 2.8 muestra los coeficientes de correlación ( $r$ ) entre parejas de variables cuantitativas medidas en *Guadua angustifolia* Kunth del Valle Cauca. La altitud mostró valores de correlación entre -0,483 y 0,022, destacándose su asociación negativa significativa con el grosor de la línea nodal en especímenes de herbario y la longitud del entrenudo en la colección viva. Esta asociación indica que a mayor altitud hay un decrecimiento del grosor de la línea nodal y de la longitud entrenudo y viceversa. También se observaron asociaciones positivas con la dureza y la base de aloja caulinar.



El relieve mostró valores de correlación entre -0,0148 y 0,15. Esta variable no mostró ninguna asociación significativa con las variables morfológicas estudiadas.

Tabla 2.7. Estadística descriptiva de las variables analizadas en este estudio para los tres biotipos de *Guadua angustifolia*. El número total de individuos analizados fue 73; no hubo datos perdidos.

Variable	Mínimo	Máximo	Media	Desviación típica	Coefficiente de variación
Altitud	18,000	2125,000	1077,209	438,238	0,407
Relieve	1,000	5,000	3,000	0,850	0,283
Altura culmo (m)	3,000	30,000	16,849	5,668	0,336
CAP (cm.)	6,200	55,986	30,056	9,754	0,325
DAP (cm.)	1,975	17,830	9,572	3,106	0,325
Longitud Entrenudo (cm.)	12,100	37,500	20,908	5,375	0,257
Grosor de la pared (cm.)	0,980	3,820	2,106	0,626	0,297
Grosor de la línea nodal (cm.)	1,000	3,400	2,203	0,547	0,248
Base de la Hoja caulinar (cm.)	6,300	72,000	37,820	11,770	0,311
Altura de la Hoja caulinar (cm.)	14,050	69,000	37,897	12,244	0,323
Ancho de la Lamina foliar (cm.)	1,000	3,000	1,844	0,367	0,199
Largo de la Lamina foliar (cm.)	9,500	20,200	14,446	2,200	0,152
Dureza	69,500	76,250	72,631	1,421	0,020
Resistencia Bacteria (%)	6,200	90,000	43,167	11,534	0,267
CAP (cm.) especímenes herbario	3,500	25,500	13,364	3,472	0,260
Longitud Entrenudo (cm.) especímenes herbario	14,100	43,200	26,061	4,921	0,189
Grosor de la pared (cm.) especímenes de herbario	0,300	2,165	0,858	0,259	0,302
Grosor línea nodal (cm.) especímenes de herbario	1,000	2,500	1,728	0,247	0,143

La altura del culmo mostró valores de correlación entre -0,162 y 0,652. Se observaron asociaciones positivas significativas con la base de la hoja caulinar ( $r = 0,376$ ), con el grosor de la línea nodal ( $r = 0,290$ ), con el ancho de la lámina foliar ( $r = 0,207$ ), con el grosor de la pared ( $r = 0,403$ ) y con CAP y DAP (1.30 m del suelo;  $r = 0,652$ ). Estas asociaciones directas sugieren que guaduas con hojas caulinares

grandes, mayores grosores de la línea nodal y de la pared, mayores anchos de la lámina foliar y CAP y DAP mayores poseen mayor altura del culmo.

Las variables CAP y DAP mostraron la asociación máxima ( $r = 1$ ) indicando que una de las dos debe ser eliminada del análisis discriminante puesto que no contribuye con nueva información para separar los biotipos. El rango de valores de correlación osciló entre -0,168 y 0,652. Se destacan las asociaciones positivas con la altura del culmo ( $r = 0,652$ ), la base y la altura de la hoja caulinar ( $r = 0,538$  y  $r = 0,338$ ), el grosor de la línea nodal ( $r = 0,586$ ) y el grosor de la pared ( $r = 0,615$ ).

La correlación del diámetro del entrenudo (1.30 m) con las mismas variables asociadas a la altura total del culmo, indica que poblaciones de guadua con entrenudos gruesos poseen culmos de mayor altura. Además, la asociación del relieve con el grosor de la línea nodal, sugiere que los culmos con diámetros mayores están relacionados con entrenudos más espaciados y estos con culmos más altos, y con una mayor probabilidad de encontrarse en relieves ondulados.

La longitud del entrenudo mostró valores de correlación entre -0,265 y 0,318, destacándose su asociación negativa con la altitud ( $r = -0,265$ ) y la base de la hoja caulinar ( $r = -0,231$ ). Esta asociación indica que a menor altitud y base de la hoja caulinar mayor longitud del entrenudo y viceversa. También se observaron asociaciones positivas con el grosor de la línea nodal en la colección viva ( $r = 0,301$ ) y en especímenes de herbario ( $r = 0,318$ ), ancho de la lámina foliar ( $r = 0,222$ ) y la longitud entre nudo en especímenes de herbario ( $r = 0,209$ ). Esto último, indica que con el tiempo se modifican las relaciones entre las variables morfológicas en la colección de herbario. Esto señala que el uso de especímenes de herbario como referentes debe ser más cuidadoso.

El grosor de la pared mostró valores de correlación entre -0,175 y 0,615, destacándose las asociaciones positivas con la altura del culmo ( $r = 0,403$ ), el CAP y DAP ( $r = 0,615$ ), el grosor de la línea nodal ( $r = 0,605$ ), la base y la altura de la hoja caulinar ( $r = 0,273$  y  $r = 0,226$ , respectivamente).

El grosor de la línea nodal mostró valores de correlación entre -0,236 y 0,605, destacándose las asociaciones positivas con la altura del culmo ( $r= 0,290$ ), el CAP y DAP ( $r= 0,586$ ) la longitud entrenudo ( $r= 0,301$ ), el grosor de la pared ( $r = 0,605$ ), la base y la altura de la hoja caulinar ( $r = 0,243$  y  $r = 0,212$ , respectivamente) y el grosor de la línea nodal de especímenes de herbario ( $r = 0,205$ ). Su relación con la forma de las guaduas se describió anteriormente. Es importante destacar la correlación negativa que presento con dureza ( $r = -0,236$ ) ya que esta característica es de valor industrial. A menor grosor de la línea nodal mayor dureza.

La base de la hoja caulinar mostró valores de correlación entre -0,233 y 0,538, destacándose su asociación negativa con la longitud entrenudo ( $r= -0,231$ ) y el grosor de la línea nodal en especímenes de herbario ( $r = -0,233$ ). También mostró asociaciones positivas con la altura del culmo ( $r= 0,376$ ), el CAP y DAP ( $r= 0,538$ ) la altura de la hoja caulinar ( $r= 0,497$ , largo lamina foliar ( $r = 0,296$ ) y grosor de la pared ( $r = 0,243$ ) y el grosor línea nodal en muestras de la colección viva (0,205). Esto último, indica que con el tiempo las relaciones entre las variables morfológicas en la colección de herbario se modifican. Estas alteraciones pueden incluso invertir estas relaciones como lo indican los coeficientes de correlación para la variable grosor de la línea nodal. Nuevamente, esto señala que el uso de especímenes de herbario como referentes debe ser más cuidadoso.

La altura de la hoja caulinar mostró valores de correlación entre -0,166 y 0,497, destacándose sus asociaciones positivas con CAP y DAP ( $r = 0,338$ ), la longitud entrenudos ( $r = 0,226$ ), el grosor línea nodal ( $r = 0,212$ ) y la base de la hoja caulinar ( $r = 0,425$ ).

El ancho de la lámina foliar mostró valores de correlación entre -0,180 y 0,262, destacándose sus asociaciones positivas con la altura del culmo ( $r = 0,207$ ), la longitud entrenudo ( $r = 0,222$ ) y el largo de la lámina foliar ( $r= 0,262$ ). El largo de la lámina foliar mostró valores de correlación entre -0,148 y 0,425, sus asociaciones positivas con CAP y DAP ( $r = 0,278$ ), con la base y la altura de la hoja caulinar ( $r = 0,296$  y  $r = 0,425$ , respectivamente) y el ancho de la lámina foliar ( $r= 0,262$ ).

La dureza mostró valores de correlación entre -0,246 y 0,257, destacándose su asociación positiva con la altitud ( $r = 0,257$ ) y sus correlaciones negativas con el grosor de la línea nodal tanto de colección viva ( $r = -0,236$ ) y de especímenes de herbario ( $r = -0,246$ ). En este caso, a mayor altitud mayor dureza y menor grosor de la línea nodal. Por lo tanto, en programas futuros de mejoramiento estas características fenotípicas deben tenerse en cuenta para producir una guadua de calidad en las cadenas productivas.

La resistencia al ataque de bacterias mostró valores de correlación entre -0,252 y 0,077, destacándose sus asociaciones negativas de la longitud entrenudos ( $r = -0,252$ ) y el grosor de la línea nodal ( $r = -0,244$ ) ambas de especímenes de herbario. En este caso, a mayor longitud el entrenudo y mayor grosor de la línea nodal menor resistencia. Esto podría significar que rodales con longitud entrenudos y grosor de la línea nodal mayores son más susceptibles al ataque de bacterias. Esto también debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar un plan de mejoramiento y manejo de la guadua en el Valle del Cauca.

### **En especímenes de Herbario**

El CAP (medido a 1,3 m.) mostró valores de correlación entre -0,075 y 0,246, destacándose sus asociaciones con la base y la altura de la hoja caulinar ( $r = 0,296$  y  $r = 0,425$ , respectivamente) y ancho de la lámina foliar ( $r = 0,262$ ). La longitud entrenudos mostró valores de correlación entre -0,508 y 0,209, destacándose sus asociaciones negativas con la resistencia bacteriana ( $r = -0,252$ ) y el grosor de la pared ( $r = -0,508$ ) y su correlación positiva con la longitud entrenudos (0,209). El grosor de la pared mostró valores de correlación entre -0,508 y 0,235, destacándose sus asociaciones negativas con el grosor entrenudos ( $r = -0,508$ ) y sus correlaciones positivas con CAP ( $r = 0,235$ ) y el grosor de la línea nodal ( $r = 0,233$ ). Por último, el grosor línea nodal mostró valores de correlación entre -0,483 y 0,318, destacándose sus asociaciones negativas con la altitud ( $r = -0,483$ ), la base de la hoja caulinar ( $r = -0,233$ ), dureza ( $r = -0,246$ ) y la resistencia bacteriana ( $r = -0,244$ ) y sus correlaciones

positivas con la longitud entrenudos ( $r = 0,318$ ), grosor de la línea nodal ( $r = 0,205$ ), CAP ( $r = 0,246$ ) y el grosor de la pared ( $r = 0,233$ ).

### **2.3.3.2. Análisis Discriminante**

En la tabla 9 se indican los valores promedio de las variables estudiadas para cada uno de los biotipos de *Guadua angustifolia*. En esta tabla se puede observar que en promedio los biotipos más diferentes son el biotipo castilla y el biotipo Cebolla, mientras que el biotipo macana es intermedio, pareciéndose más cebolla. DAP, Longitud entrenudo y grosor de la pared diferencian significativamente a cebolla de castilla y macana. DAP y grosor de la línea nodal muestran a cebolla como la de menor tamaño, a macana intermedia y a castilla como la de mayor calibre. El biotipo Bicolor es similar al biotipo cebolla (tabla 2.8).

La tabla 2.9 indica que el biotipo castilla se diferencia significativamente de cebolla, Cebolla de Macana. El Biotipo Bicolor no mostro distancias de Fisher significativas con ninguno de los biotipos estudiados. Todos los biotipos de *G. angustifolia* mostraron diferencias significativas con las especies *G. uncinata* y *Guadua amplexifolia*. Ninguno se diferenció de *Guadua glauca*, sugiriendo que no existen diferencias significativas entre *G. angustifolia* y *G. glauca*. Por lo contrario, *G. glauca* solo se diferencia de *Guadua amplexifolia*. Las variables subrayadas mostraron diferencias significativas mediante prueba unidimensional de igualdad de las medias de las clases (Tabla 2.10). Este grado de diferenciación permite continuar haciendo el análisis discriminante, explicando la varianza fenotípica de los biotipos a partir de dos factores que conjuntamente describen el 80,9 % de la varianza (Tabla 2.10 y Figura 2.5).

En el Figura 2.6 se observa que los centroides correspondientes a cada biotipo no están sobrepuestos, sin embargo, la dispersión de la nube de datos muestra áreas sobrepuestas con pocos individuos dentro de ellas.

Tabla 2.8. Matriz de correlación (r) entre parejas de variables cuantitativas medidas en *Guadua angustifolia* Kunth del Valle Cauca.

	Altitud	Relieve	Altura culmo (m)	CAP (cm.)	DAP (cm.)	Long. Entrenudo (cm.)	Grosor pared (cm.)	Grosor línea nodal (cm.)	Base de la Hoja caulinar (cm.)	Altura de la Hoja caulinar (cm.)	Ancho de la Lamina foliar (cm.)	Largo de la Lamina foliar (cm.)	Dureza	Resist. Bacteria (%)	CAP (cm.) Espec. Herb.	Longitud Entrenudo (cm.) Espec. Herb.	Grosor de la pared (cm.) Espec. Herb.	Grosor de la línea nodal (cm.) Espec. Herb.
Altitud	1,000	0,154	0,145	0,100	0,100	-0,265	-0,175	-0,155	0,261	0,098	0,022	0,075	0,257	0,077	0,056	-0,010	-0,172	-0,483
Relieve	0,154	1,000	-0,037	0,047	0,047	0,038	0,107	0,039	-0,099	-0,108	0,012	-0,148	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
Altura culmo (m)	0,145	-0,037	1,000	0,652	0,652	-0,162	0,403	0,290	0,376	0,155	0,207	0,157	-0,023	0,023	-0,141	0,067	-0,151	-0,092
CAP (cm.)	0,100	0,047	0,652	1,000	1,000	-0,168	0,615	0,586	0,538	0,338	0,108	0,278	-0,067	-0,080	-0,075	-0,018	-0,081	-0,040
DAP (cm.)	0,100	0,047	0,652	1,000	1,000	-0,168	0,615	0,586	0,538	0,338	0,108	0,278	-0,067	-0,080	-0,075	-0,018	-0,081	-0,040
Longitud Entrenudo (cm.)	-0,265	0,038	-0,162	-0,168	-0,168	1,000	-0,080	0,301	-0,231	-0,166	0,222	-0,135	-0,087	0,007	0,097	0,209	-0,198	0,318
Grosor de la pared (cm.)	-0,175	0,107	0,403	0,615	0,615	-0,080	1,000	0,605	0,273	0,226	0,118	0,173	-0,151	-0,080	0,019	-0,115	0,192	0,189
Grosor línea nodal (cm.)	-0,155	0,039	0,290	0,586	0,586	0,301	0,605	1,000	0,243	0,212	0,145	0,194	-0,236	-0,091	-0,002	0,058	-0,088	0,205
Base Hoja caulinar (cm.)	0,261	-0,099	0,376	0,538	0,538	-0,231	0,273	0,243	1,000	0,497	0,121	0,296	0,069	0,022	0,011	-0,132	0,049	-0,233
Altura Hoja caulinar (cm.)	0,098	-0,108	0,155	0,338	0,338	-0,166	0,226	0,212	0,497	1,000	-0,105	0,425	0,075	-0,094	0,047	-0,096	0,131	0,093
Ancho Lamina foliar (cm.)	0,022	0,012	0,207	0,108	0,108	0,222	0,118	0,145	0,121	-0,105	1,000	0,262	0,020	-0,012	-0,180	0,087	0,008	0,023
Largo Lamina foliar (cm.)	0,075	-0,148	0,157	0,278	0,278	-0,135	0,173	0,194	0,296	0,425	0,262	1,000	-0,023	-0,101	-0,133	-0,084	-0,085	0,025
Dureza	0,257	0,000	-0,023	-0,067	-0,067	-0,087	-0,151	-0,236	0,069	0,075	0,020	-0,023	1,000	-0,040	0,026	-0,136	-0,004	-0,246

Continuación de la Tabla 2.8.

Resistencia					-													
Bacteria (%)	0,077	0,000	0,023	-0,080	0,080	0,007	-0,080	-0,091	0,022	-0,094	-0,012	-0,101	-0,040	1,000	-0,056	-0,252	-0,077	-0,244
CAP (cm.)					-													
Espec.Herb.	0,056	0,000	-0,141	-0,075	0,075	0,097	0,019	-0,002	0,011	0,047	-0,180	-0,133	0,026	-0,056	1,000	0,057	0,235	0,246
Longitud																		
Entrenudo																		
(cm.)					-													
Espec.Herb.	-0,010	0,000	0,067	-0,018	0,018	0,209	-0,115	0,058	-0,132	-0,096	0,087	-0,084	-0,136	-0,252	0,057	1,000	-0,508	-0,009
Grosor de la																		
pared (cm.)					-													
Espec.Herb.	-0,172	0,000	-0,151	-0,081	0,081	-0,198	0,192	-0,088	0,049	0,131	0,008	-0,085	-0,004	-0,077	0,235	-0,508	1,000	0,233
Grosor de la																		
línea nodal																		
(cm.)					-													
Espec.Herb.	-0,483	0,000	-0,092	-0,040	0,040	0,318	0,189	0,205	-0,233	0,093	0,023	0,025	-0,246	-0,244	0,246	-0,009	0,233	1,000
Espec.Herb. = especímenes herbario							Resist. = Resistencia											

Tabla 2.9. Valores medios de las variables estudiadas en cada uno de los Biotipos de *Guadua angustifolia*. Donde 1: Castilla; 2= Cebolla, 3= Macana, 7 = Bicolor y en las especies 4 = *G. uncinata*, 5 = *Guadua amplexifolia* y 6 = *Guadua glauca*.

Variable	Especies del Genero Guadua / Variedad de <i>Guadua angustifolia</i>						
	1	2	3	4	5	6	7
Altitud	1272,25	1135,79	1031,31	420,00	724,14	522,50	1221,60
Relieve	3,75	2,91	3,08	3,00	3,00	3,00	3,00
Altura culmo (m)	22,25	16,45	21,38	6,50	9,33	13,50	14,20
CAP (cm.)	50,35	27,95	36,87	7,95	18,00	27,35	31,78
DAP (cm.)	16,04	8,90	11,74	2,53	5,73	8,71	10,12
Longitud Entrenudo (cm.)	20,93	20,49	19,48	34,15	18,80	37,00	17,84
Grosor de la pared (cm.)	2,93	1,80	2,82	1,29	2,86	2,40	2,04
Grosor línea nodal (cm.)	3,03	2,06	2,48	1,95	1,80	3,15	2,06
Base Hoja caulinar (cm.)	46,37	36,58	42,42	9,30	38,00	38,50	40,94
Altura Hoja caulinar (cm.)	41,05	37,42	37,06	26,28	37,90	31,75	48,84
Ancho Lamina foliar (cm.)	1,88	1,78	1,99	2,50	1,73	1,90	1,76
Largo Lamina foliar (cm.)	14,11	14,42	14,25	15,00	14,17	13,05	15,92
Dureza	72,63	72,91	72,32	71,32	72,46	70,50	72,45
Resistencia Bacteria (%)	43,17	42,86	44,20	43,17	43,17	43,17	43,17
CAP (cm.) Espec.Herb.	13,36	13,39	13,52	9,50	12,75	16,58	13,36
Longitud Entrenudo (cm.) Espec.Herb.	26,06	26,08	26,13	33,75	18,12	29,33	26,06
Grosor de la pared (cm.) Espec.Herb.	0,86	0,83	0,84	0,65	1,61	0,68	0,86
Grosor de la línea nodal (cm) Espec.Herb.	1,73	1,70	1,71	2,10	1,91	1,91	1,73



Tabla 2.10. Prueba unidimensional de igualdad de las medias para cada uno de los Biotipos de *Guadua angustifolia*. Donde 1: Castilla; 2= Cebolla, 3= Macana, 7 = Bicolor y en las especies 4 = *G. uncinata*, 5 = *Guadua amplexifolia* y 6 = *Guadua glauca*.

Variable	Lambda a	F	GDL1	GDL2	p-valor
Altitud			6	66	
Relieve			6	66	
Altura culmo (m)			6	66	
CAP (cm.)			6	66	
DAP (cm.)		14,44			<
	0,432	0	6	66	0,0001
Long. Entrenudo (cm.)					<
	0,537	9,488	6	66	0,0001
Grosor pared (cm.)		15,59			<
	0,414	3	6	66	0,0001
Grosor línea nodal (cm.)			6	66	
Base de la Hoja caulinar (cm.)			6	66	
Altura de la Hoja caulinar (cm.)			6	66	
Ancho de la Lamina foliar (cm.)			6	66	
Largo de la Lamina foliar (cm.)	0,952	0,550	6	66	0,768
Dureza			6	66	
Resistencia Bacteria (%)			6	66	
CAP (cm.) Especímenes del					
Herbario	0,940	0,702	6	66	0,649
Long. Entrenudo (cm.)					
Especímenes del Herbario			6	66	
Grosor pared (cm.) Especímenes					<
del Herbario	0,613	6,944	6	66	0,0001
Grosor línea nodal (cm.)			6	66	

En la tabla 2.11 se indica el grado de diferenciación entre los biotipos de *Guadua angustifolia* y dos especie del mismo género. En la tabla 2.12 se muestran los valores propios y porcentaje de discriminación aportado por cada factor. En la tabla 2.13 se pone a prueba la capacidad de asignar correctamente los individuos a cada biotipo propuesto observándose un 82% de aciertos.

Tabla 2.11. Distancias de Fisher (debajo de la diagonal) y valores de probabilidad (P). Donde 1: Castilla; 2= Cebolla, 3= Macana, 7 = Bicolor y en las especies 4 = *G. uncinata*, 5 = y 6 = *Guadua glauca*.

	1	2	3	4	5	6	7
				<	<		
1	0,000	0,004	0,652	0,0001	0,0001	0,055	0,188
					<		
2	2,615	0,000	0,001	0,004	0,0001	0,115	1,000
				<			
3	0,835	3,024	0,000	0,0001	0,0000	0,116	0,614
4	4,639	2,640	3,956	0,000	0,0060	0,417	0,007
5	4,556	4,493	3,614	2,466	0,000	0,005	0,001
6	1,790	1,545	1,541	1,060	2,544	0,000	0,137
7	1,372	0,187	0,870	2,451	2,978	1,484	0,000

Tabla 2.12. Valores propios y porcentaje de discriminación aportado por cada factor.

	F1	F2	F3	F4	F5	F6
Valor propio	2,538	1,715	0,819	0,108	0,051	0,025
Discriminación (%)	48,293	32,633	15,588	2,050	0,968	0,468
Acumulado (%)	48,293	80,926	96,514	98,564	99,532	100,000

Figura 2.5. Valores propios y porcentaje de discriminación aportado por cada factor.

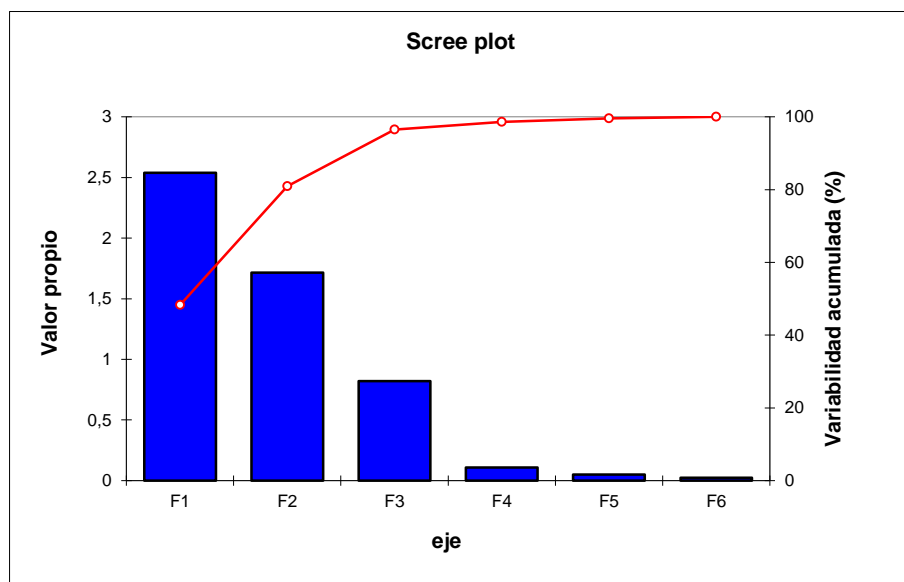
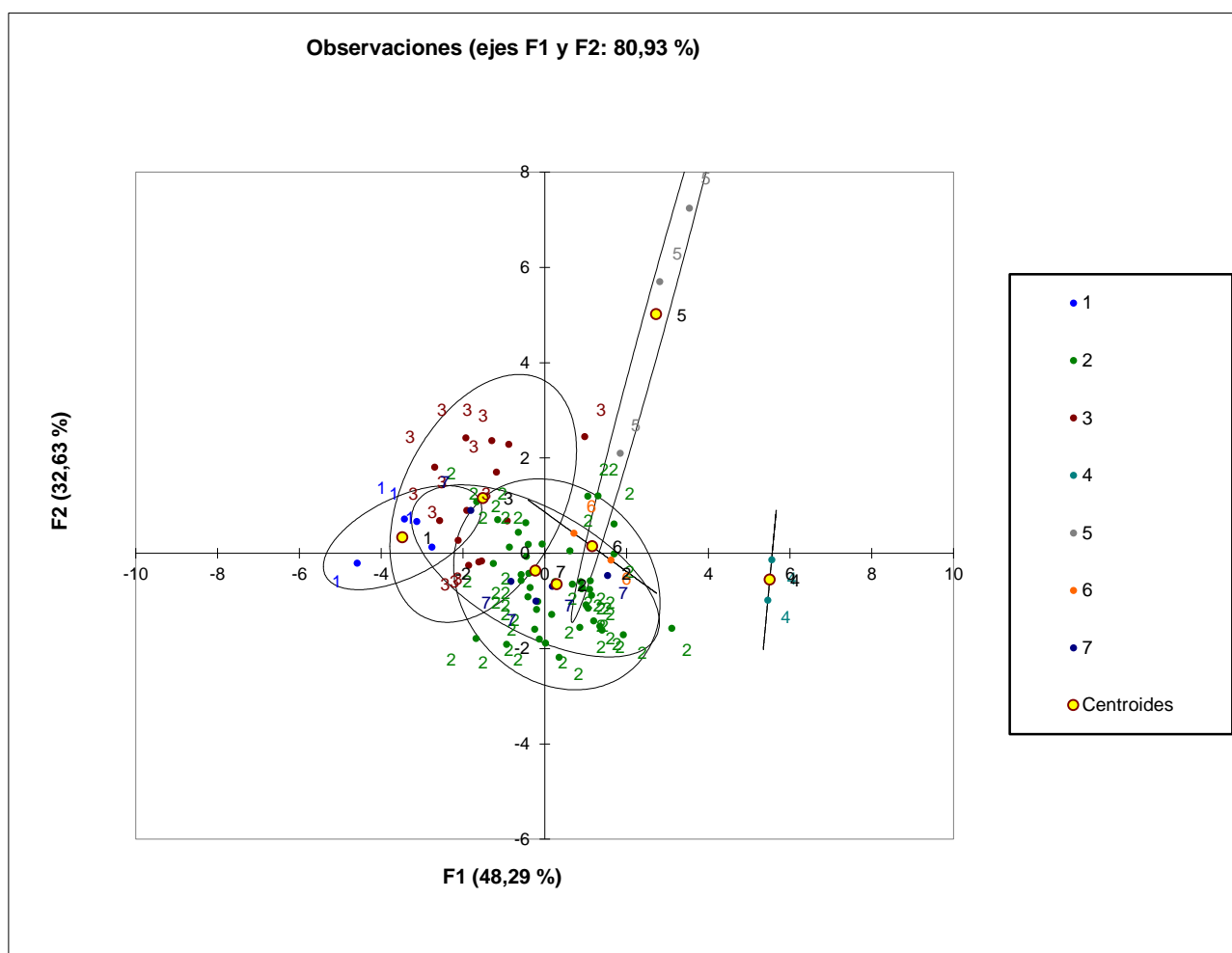


Tabla 2.13. Matriz de confusión para los resultados de validación cruzada.

de \ a	1	2	3	4	5	6	7	Total	% correcto
1	3	0	1	0	0	0	0	4	75,00
2	0	41	2	0	0	1	0	44	93,18
3	0	2	10	0	0	1	0	13	76,92
4	0	0	0	2	0	0	0	2	100,00
5	0	1	0	0	2	0	0	3	66,67
6	0	0	0	0	0	2	0	2	100,00
7	0	4	1	0	0	0	0	5	0,00
Total	3	48	14	2	2	4	0	73	82,19

Figura 2.6. Representación gráfica de las observaciones con base en los ejes 1 y 2.



### Modelo descriptivo de los tres Biotipos estudiados de *Guadua angustifolia*.

#### Regresión de la variable Forma

En primer lugar, se asigna como variable dependiente al biotipo (forma) respecto a las variables medidas en el estudio. Luego, se realizó una regresión múltiple por etapas para seleccionar las variables que se incluirán en el modelo por describir mejor cada biotipo (tabla 2.14). En este análisis no se incluye el biotipo bicolor por no diferenciarse de cebolla. Las variables DAP (cm.) / Longitud Entrenudo (cm.) / Grosor pared (cm.) y Dureza describen el 55,3 % de la variación de los biotipos. En

segundo lugar, se realizó un análisis de varianza con las variables incluidas para probar el modelo (tabla 2.15 A y B). También se estimaron los parámetros del modelo con sus significancia (Tabla 2.15 C).

#### Ecuación del modelo:

$$\text{Biotipo (Y)} = 11,5583593866196 - 0,2669203270515 \cdot \text{DAP (cm)} + 5,97815060994158 \cdot 10^{-2} \cdot \text{Long. Entrenudo (cm.)} + 1,10322461981233 \cdot \text{Grosor pared (cm)} + 0,021375464637597 \cdot \text{Base de la Hoja caulinar (cm)} - 0,15094753230009 \cdot \text{Dureza}$$

Tabla 2.14. Resumen de la selección de las variables incluidas en el modelo por la regresión sobre la variable Biotipo (Forma). Donde IN significa variable incluida y OUT Excluida.

No. de variables	Variables	Variable IN/OUT	Estado	MEC	R <sup>2</sup>	R <sup>2</sup> ajustado
1	Altitud	Altitud	IN	0,928	0,134	0,121
2	Altitud / Longitud Entrenudo (cm.)	Longitud Entrenudo (cm.)	IN	0,858	0,212	0,188
		Grosor pared				
3	Altitud / Longitud Entrenudo de (cm.) / Grosor pared de especímenes de herbario (cm.)	de especímenes de herbario (cm.)	IN	0,802	0,275	0,241
4	Altitud / Longitud Entrenudo (cm.) / Grosor pared (cm.) / Grosor pared de especímenes de herbario (cm.)	Grosor pared (cm.)	IN	0,764	0,319	0,276
5	Altitud / DAP (cm.) / Longitud Entrenudo (cm.) / Grosor pared	DAP (cm.)	IN	0,541	0,526	0,487

	(cm.) / Grosor pared de especímenes de herbario (cm.)								
	DAP (cm) / Longitud Entrenudo								
4	(cm) / Grosor pared (cm) / Grosor pared de especímenes de herbario (cm.)	Altitud	OUT	0,541	0,518	0,488			
	DAP (cm.) / Longitud Entrenudo								
5	(cm.) / Grosor pared (cm.) / Dureza / Grosor pared de especímenes de herbario (cm.)	Dureza	OUT	0,508	0,555	0,519			
		Grosor pared							
	DAP (cm.) / Longitud Entrenudo de								
4	(cm.) / Grosor pared (cm.) / Dureza	especímenes de herbario (cm.)	OUT	0,513	0,543	0,514			
	DAP (cm.) / Longitud Entrenudo								
5	(cm.) / Grosor pared (cm.) / Base de la Hoja caulinar (cm.) / Dureza	Base de la Hoja caulinar (cm.)	OUT	0,472	0,586	0,553			

Tabla 2.15. (A) Análisis de la varianza con las variables escogidas Calculado contra el modelo  $Y = \text{Media}(Y)$ . (B) Suma de cuadrados del análisis Tipo I se indica debajo de la ANOVA. (C) Parámetros del modelo con su significancia.

(A) ANOVA

Fuente	GDL	Suma de los cuadrado s	Media de los cuadrados	F	Pr > F
Modelo	5	41,488	8,298	17,572	< 0,0001
Error	62	29,277	0,472		
Total corregido	67	70,765			

(B) Suma de Cuadrados

Fuente	GDL	Suma de cuadrado s	Cuadrado s Medios	F	Pr > F
DAP (cm.)	1	9,426	9,426	19,961	< 0,0001
Longitud Entrenudo (cm.)	1	6,159	6,159	13,043	0,001
Grosor pared (cm.)	1	0,528	0,528	1,119	0,294
Base de la Hoja caulinar (cm.)	1	2,680	2,680	5,675	0,020
Dureza	0	0,000	0,000	0,000	0,000

(C) Parámetros del modelo:

Fuente	Valor	Desviación típica	t	Pr >  t
Intersección	11,558	4,339	2,664	0,0100
Altitud	0,000	0,000		
Relieve	0,000	0,000		
Altura culmo (m)	0,000	0,000		
CAP (cm.)	0,000	0,000		
DAP (cm.)	-0,267	0,039	-6,933	< 0,0001
Long. Entrenudo (cm.)	0,060	0,016	3,765	0,000
Grosor pared (cm.)	1,103	0,168	6,565	< 0,0001
Grosor línea nodal (cm.)	0,000	0,000		
Base Hoja caulinar (cm.)	0,021	0,008	2,538	0,0140
Altura de la Hoja caulinar (cm.)	0,000	0,000		
Ancho Lamina foliar (cm.)	0,000	0,000		
Largo de la Lamina foliar (cm.)	0,000	0,000		
Dureza	-0,151	0,059	-2,580	0,012
Resistencia Bacteria (%)	0,000	0,000		
<u>Especímenes de Herbario:</u>				
CAP (cm.)	0,000	0,000		
Longitud Entrenudo (cm.)	0,000	0,000		
Grosor pared (cm.)	0,000	0,000		
Grosor línea nodal (cm.)	0,000	0,000		

## 2.4. Discusión

En la Tabla 1 se observa un amplio rango de valores en los descriptores cuantitativos lo que indica una gran variabilidad fenotípica en los rodales de guadua estudiados en el Valle del Cauca y la existencia de guaduales muy adultos y jóvenes, así como muy extensos y fraccionados.

Pantoja y Acuña (2005) encuentran en su investigación que a medida que se aumenta la altitud se encuentran las guaduas más duras, así mismo con los suelos secos y que la razón del aumento de la dureza es debido a las temperaturas por debajo de la media y por esta razón, tiene un crecimiento más lento. El tipo de suelo es indispensable para las características de la guadua. La Guadua no crece en terrenos que posean un alto nivel freático, pero por ejemplo, en los bancos escarpados de los ríos, el complejo sistema de raíces y sus redes, pueden transportar por medio de ellas la humedad a los tallos secos localizados más arriba. Las relaciones establecidas en este estudio son congruentes con los encontrados en la tesis de Pantoja y Acuña (2005).

La correlación del diámetro del entrenudo (1.30 m) con las mismas variables asociadas a la altura total del culmo, indica que poblaciones de guadua con entrenudos gruesos poseen culmos de mayor altura. Además, la asociación del relieve con el grosor de la línea nodal, sugiere que los culmos con diámetros mayores están relacionados con entrenudos más espaciados y estos con culmos mas altos, y con una mayor probabilidad de encontrarse en relieves ondulados.

Si se tienen en cuenta las asociaciones significativas descritas en los resultados, se podría pensar que en *Guadua angustifolia* a medida que los culmos alcanzan mayores alturas la lámina foliar es menos alargada mientras que las hojas caulinares son más alargadas, ya que la base se reduce con la altura del culmo. Esto podría estar asociado con la necesidad de tener mayor área foliar para desarrollar más eficientemente los procesos fotosintéticos, la captura de carbono, la respiración y la acumulación de biomasa, entre otras, acordes con los



requerimientos respecto al tamaño de la planta. Tanto la base y la altura de la hoja caulinar como el ancho y el largo de la lámina foliar apoyan la hipótesis de que estas asociaciones están relacionadas con la captación y almacenamiento de nutrientes indicado antes.

A mayor altitud mayor dureza y menor grosor de la línea nodal. Por lo tanto, en programas futuros de mejoramiento estas características fenotípicas deben tenerse en cuenta para producir una guadua de calidad en las cadenas productivas.

A mayor longitud el entrenudo y mayor grosor de la línea nodal menor resistencia al ataque de bacterias. Esto podría significar que rodales con longitud entrenudos y grosor de la línea nodal mayores son más susceptibles al ataque de bacterias. Esto también debe tenerse en cuenta a la hora de diseñar un plan de mejoramiento y manejo de la guadua en el Valle del Cauca.

Las variables DAP (cm.) / Longitud Entrenudo (cm.) / Grosor pared (cm.) y Dureza describen el 55,3 % de la variación de los biotipos.

En promedio los biotipos más diferentes son el biotipo castilla y el biotipo Cebolla, mientras que el biotipo macana es intermedio, pareciéndose más cebolla. DAP, Longitud entrenudo y grosor de la pared diferencian significativamente a cebolla de castilla y macana. DAP y grosor de la línea nodal muestran a cebolla como la de menor tamaño, a macana intermedia y a castilla como la de mayor calibre. El biotipo Bicolor es similar al biotipo cebolla.

El biotipo castilla se diferencia significativamente de cebolla y cebolla de Macana. El Biotipo Bicolor no mostró distancias de Fisher significativas con ninguno de los biotipos estudiados. Todos los biotipos de *G. angustifolia* mostraron diferencias significativas con las especies *G. uncinata* y *Guadua amplexifolia*. Ninguno se diferenció de *Guadua glauca*, sugiriendo que no existen diferencias morfológica entre *G. angustifolia* y *G. glauca*. *G. glauca* solo se diferencia de *Guadua amplexifolia*.

Con el tiempo las relaciones entre las variables morfológicas en la colección de herbario se modifican. Estas alteraciones pueden incluso invertir estas relaciones como lo indican los coeficientes de correlación para la variable grosor de la línea nodal. Nuevamente, esto señala que el uso de especímenes de herbario como referentes debe ser más cuidadoso.

El fenotipo depende del genotipo, del ambiente y de la interacción genotipo por ambiente; las variables cuantitativas están controladas por muchos pares de genes y la interacción genotipo por ambiente es importante en las variables de respuesta. Las variables evaluadas para los diferentes usos: longitudes, diámetros, espesores, volúmenes, propiedades físico-mecánicas, son posiblemente controladas por muchos genes.

El efecto del ambiente ha sido reconocido en varias investigaciones, Camargo (2004, 2005, 2006), Castaño 1987, Agudelo y Toro 1994, pero en ésta investigación es la primera vez que se reconoce de manera específica el efecto del genotipo lo cual puede explicar las variaciones en características en ambientes similares. Lo anterior permite también orientar las investigaciones que sobre propiedades de las guaduas se realicen, pues no se pueden realizar generalizaciones con los resultados obtenidos, por ejemplo Correa et al. (2010) al realizar un estudio interesante para establecer relaciones entre la edad de los culmos y las características de resistencia físico-mecánicas, pero solo se obtienen muestras de un gradual en Caicedonia, éstos resultados no pueden generalizarse y deben realizarse estudios en otras zonas donde se encuentren genotipos diferentes para poder establecer recomendaciones generales sobre la edad de los culmos que presenten las mejores características.

Al identificar materiales superiores de *Guadua angustifolia*, para construcción pre-industrialización y muebles y artesanías:

Se puedan establecer ensayos de rendimiento en varias localidades y estimar el efecto genético, el efecto ambiental y la interacción genotipo por ambiente, también

se puede estimar la contribución de cada genotipo a ésta interacción y se pueden identificar genotipos con adaptabilidad local o específica para cada uno de los usos.

Se puede iniciar un programa de mejoramiento utilizando como progenitores los genotipos seleccionados con base en las asociaciones fenotípicas establecidas, para ello se deben realizar estudios básicos de biología floral, algunos de los cuales están en proceso por parte del Grupo de Investigación en Diversidad Biológica como el porcentaje de apomixis, el nivel de alogamia y la multiplicación sexual.

Se puede dar a la guadua el carácter de cultivo agrícola lo que facilita su explotación y disminuye los costos asociados al carácter de especie protegida, esto se menciona persistentemente en los encuentros y seminarios de guadua.

## **2.5. Referencias**

Agudelo, B. & I. Y. Toro, 1994. Evaluación del desarrollo de los bosques de *Guadua angustifolia* en la zona de jurisdicción de la CVC bajo diferentes condiciones de sitio, con fines de reforestación. Tesis. Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Forestal, Ibagué. Pp. 168.

Camargo, J.C. 2005. Silvicultura, crecimiento y productividad de la *Guadua angustifolia* Kunth en el eje cafetero de Colombia. En memorias: Primer congreso mexicano del bambú. Xalapa, Mexico. Diciembre.

Camargo, J. C. 2006. Growth and productivity of the bamboo species *Guadua angustifolia* Kunth in the coffee region of Colombia. Tesis Doctorado. Universidad de Gottingen. Alemania. 205p.

Castaño, F. 1987. Sistemas silviculturales para la propagación y manejo de la guadua en Colombia. Revista técnica Corporación Autónoma del Valle del Cauca 1:35-41.

Castaño, F. 2002b. "Manejo de Guaduales Plantados". MSBC. GTZ – Minambiente – CARs. Armenia -- Quindío. Octubre 22 – 25.

Correa, E.; Jaramillo, C.; Manchester, S. and M. Gutiérrez. 2010. A fruit and leaves of *Rhamnaceous affinities* from the late cretaceous (Maastrichtian) of Colombia. American Journal of Botany 97(1): 71–79.

Font Quer, P. 1965. Diccionario de Botánica. Ed. Labor. Barcelona, España.

Gómez, M. G.; Cruz, V. S.; Agudelo, H. A. y Giraldo, H. E. 2000. Caracterización morfológica de y anatómica de cuatro biotipos de *Guadua angustifolia* Kunth. En: Monografías de la flora andina. Vol, 3. ISSN 0123-9538. 2000.

Gómez, J.M., Valladares, F. & Puerta-Piñero, C. 2004. Differences between structural and functional environmental heterogeneity caused by seed dispersal. Functional Ecology, 18, 787–792.

Londoño, X. 1989. Una nueva variedad de *Guadua angustifolia* Kunth de Colombia. Revista de la Academia Colombiana de Ciencias Exactas, Físicas y Naturales 17(65): 379-381.

Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae: Bambusoideae). Caldasia 16 (77):139-153.

Londoño Pava, Ximena. 1992. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo. En: CESPEDESIA, Vol. 19. Nos 62-63 (enero – diciembre 1992). Cali, Colombia; p. 113.

Martínez Cáceres, D. E.. 1992. Puentes en do mayor (Tesis de grado). En: Congreso Mundial de Bambú / Guadua. (1º: 1992: Pereira). Memorias I Congreso Mundial de Bambú / Guadua. Pereira; 1992; p.173.

McClure. F. A. 1973. The bamboos- A fresh perspective. Cambridge: Haryard UIiversity Press. 1966. -----Genera of bamboos native to the New World

(Gramineae: Bambúsoideae). Ed. T.R. Soderstrom. Smithsonian Contr. Bot. 9: xii 1-148.

Pantoja Trujillo, N. H. y D. F. Acuña Jiménez. 2005. Resistencia al corte paralelo de la fibra de *Guadua angustifolia*. Unidad de Estructuras, Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C.94p.

## CAPITULO 3.

### **Estimación de la diversidad genética en los rodales naturales de *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) en el Valle del Cauca- Colombia, para el uso sostenible y conservación de este recurso genético**

#### **Resumen**

*Guadua angustifolia*, bambú americano, es una especie importante a nivel histórico - cultural en Colombia por su amplia utilidad en la industria de la construcción y es clave en la conservación de cuencas y humedales. Debido a su utilización y al crecimiento de los asentamientos humanos, son pocas las hectáreas naturales de *G. angustifolia* existentes en nuestro país (31.000 ha), ocasionando pérdida de información biológica especialmente en su diversidad genética, la cual se desconoce para las poblaciones naturales. Adicionalmente, su propagación con fines económicos o de reforestación, se está realizando a través de métodos asexuales. En el Valle del Cauca, los guaduales naturales han sido desplazados por los cultivos de caña, reduciéndolos sustancialmente. En este estudio se evaluó la diversidad genética de *G. angustifolia* en 22 rodales naturales del Valle del Cauca mediante el desarrollo de 8 microsatélites diseñados para la especie, obteniéndose cinco marcadores altamente polimórficos y tres en equilibrio Hardy Weinberg que incrementan la variabilidad dentro de individuos. Sin embargo, la variabilidad genética entre individuos dentro de cada localidad es muy homogénea y la variación en tres localidades fue altamente significativa, indicando que en el Valle del Cauca, los rodales presentan conformación genética diferente. Es decir, existe estructura genética significativa, lo cual insinúa que los diferentes rodales evolucionaron en ambientes muy heterogéneos. Esto es corroborado por los resultados de la AMOVA la cual muestra alta diferenciación con base en dos modelos diferentes  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , conocimiento de gran utilidad para la creación, planeación de estrategias de conservación y uso sostenible.

**Palabras Clave:** Polimorfismo, microsatélites, *Guadua angustifolia*, conservación, estructura genética, diversidad.

### 3.1. Introducción

*Guadua angustifolia* es la especie que Kunth escogió como tipo del género *Guadua*. Su epíteto específico 'angustifolia' significa en latín 'hoja angosta' y describe una de sus características morfológicas más sobresalientes (Judziewicz et al. 1999). Esta ha sido de vital importancia en aspectos históricos y culturales en Colombia y Ecuador. Con ella los indígenas construyeron instrumentos, artesanías y viviendas, fue clave en los procesos de colonización en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca. Hoy en día, juega un importante papel económico, ya que de ella se extrae pulpa para papel y madera (Cruz 1994, Londoño 1991). En áreas rurales de Colombia y demás países Latinoamericanos, la guadua se emplea en cercos, corrales, diseños agropecuarios, tutores o soportes, diques y conductos de agua. A nivel artesanal y ornamental, son numerosos los usos que se le ha dado a *G. angustifolia* (Castaño & Moreno 2004, Londoño 1991). Desde el punto de vista industrial, hay una gran potencialidad de la guadua como productora de celulosa para la industria Papelera Nacional y para la elaboración de láminas y paneles de triple, sin embargo, su aprovechamiento industrial en Colombia está aún por desarrollarse (Castaño & Moreno 2004, Cruz 1994, Londoño 1991).

En Colombia existen cerca de 51000 Ha de guadua, de las cuales, 7 986 Ha se encuentran en el Departamento de Valle del Cauca, ocupando un 15.6% del total nacional (SISAV 2006). En escritos de la época de la colonización se comenta como el Valle del Cauca estaba completamente cubierto de guaduales, incluso se dice que los asentamientos indígenas de la región se escondían entre estos densos bosques cuando eran atacados por los españoles (Cruz 1994). Con el paso del tiempo y el establecimiento de los asentamientos humanos y sus cultivos, especialmente el de la caña de azúcar, los guaduales han sido desplazados poco a poco. En la actualidad, el Valle del Cauca cuenta con unos pocos relictos naturales que están bajo el manejo de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC (SISAV 2006).

Hoy en día, con la implementación de la Guadua como un producto comercial, de sus cadenas productivas y el establecimiento de su cultivo bajo metodologías asexuales para su aprovechamiento (Castaño & Moreno 2004), se hace necesario el establecimiento de medidas de conservación de sus recursos genéticos silvestres, aún desconocidos (Rao & Hodgkin 2002). Es indispensable el conocimiento de la diversidad genética y de los diferentes acervos genéticos con los que cuenta *G. angustifolia* para una implementación adecuada de sistemas de selección de variedades y cultivares, y en los programas de fitomejoramiento, para así evitar en un futuro una posible erosión genética en sus cultivares, tal y como se observó en la cebada europea (Yahiaoui 2008), especie comercial en donde se han desarrollado cultivares de alto rendimiento a través de programas de selección y en donde se observó una reducción de la base genética de los cultivares actuales. Fischbeck (1992) reporta que según los registros históricos la erosión genética en la cebada pudo haber ocurrido como consecuencia del uso de un número muy limitado de variedades criollas y cultivares primitivos en los cruces durante las etapas primarias del fitomejoramiento moderno en Europa. Asimismo, el conocimiento y conservación de la diversidad genética de *G. angustifolia* es indispensable para la permanencia y evolución de la especie en estado natural, por ejemplo, para su resiliencia frente a cambios potenciales en el ambiente (Frankhan et al. 2002, Chasan 1991, Fontdevila & Moya 1999, Hedrick & Miller 1992).

Con el fin de identificar genéticamente estos materiales seleccionados se utilizan técnicas moleculares entre las cuales se encuentran los microsatélites, que son secuencias repetidas; en los genomas de organismos superiores se encuentran tres tipos de secuencias de ADN repetido: satélites, minisatélites y microsatélites, con diferentes tamaños (Armour et al. 1999; Hancock 1999), los loci tienen alta tasa de mutación (Eisen 1999). Los microsatélites (Litt and Luty 1989), también conocidos como secuencias simples repetidas, SSRs (Tautz et al. 1986), repeticiones cortas en tándem (STRs) o polimorfismos en la longitud de la secuencia simple, SSLPs (McDonald and Potts 1997), son la clase más pequeña de las secuencias simples de DNA repetitivo. Algunos (Armour et al. 1999) definen los microsatélites como



repeticiones de 2-8 bp, otros (Goldstein and Pollock 1997) como 1-6 o igualmente 1-5 bp repetidas (Schlotterer 1998).

Chambers and MacAvoy (2000) sugirieron que es la repetición estricta de 2-6 bp, en concordancia con las descripciones de los autores originales. Estas secuencias, arregladas en serie, que se encuentran esparcidos por todo el genoma de los organismos eucariotas (Tautz. 1989) y procariotas (Zane et al. 2002) han sido encontrados en varias especies de mamíferos (Moore et al. 1991, Rassman et al. 1991) y en otros eucariotas tales como insectos (Estaoup et al. 1993), aves (Moran 1993), peces (Rico et al. 1996), ratones (Kondo et al. 1993) y plantas (Zhao & Kochert 1992, Zhao & Kochert 1993, Morgante & Olivieri, 1993).

La aplicación de técnicas moleculares para el estudio de la diversidad genética en bambú se ha incrementado en los últimos 10 años. Se conocen estudios con RFLP's en el género *Phyllostachys* (Friar & Kochert 1991, 1994), análisis de isoenzimas de una selección de cinco géneros (Heng et al. 1996), filogenia con DNA cloroplástico de bambús Asiáticos (Watanabe et al. 1994) y bambúes del nuevo mundo (Kobayashi 1997) y el uso del cloroplasto RP 116 para determinar relaciones filogenéticas en el género *Chusquea* (Kelchner & Clark 1997). El primer análisis filogenético molecular del mayor clado de bambús leñosos del viejo mundo con secuencias de ADNcp y nucleares asociándolos a características de los frutos (Yang et al. 2008); se encuentra que elementos transponibles son frecuentes en bambúes y se realizan análisis filogenéticos con las secuencias (Zhou et al. 2010). Se usan ocho regiones no codificantes de ADNcp en 146 especies de 26 géneros de la tribu Arundinarieae para establecer relaciones entre especies (Zeng et al. 2010) y en especies americanas Ruiz-Sánchez (2010) con características morfológicas y moleculares sugiere que en el género *Otatea* se tengan siete entidades en lugar de tres.

Respecto a la diversidad genética de guadua se han efectuado tres estudios desarrollados con el objetivo de evaluar la diversidad genética conservada en el Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María

Céspedes, Tuluá (Marulanda et al. 2002 y 2007) y la variabilidad molecular de *G. angustifolia* ha sido estudiada mediante evaluaciones preliminares con marcadores RAMs, Random Amplified microsatellites (Muñoz et al. 2007, 2011), con ocho Loci microsatélites (Torres 2008, Pérez – Galindo et al. 2009) y sólo el estudio de Potosí et al. (2006) ha sido realizado en relictos naturales de *G. angustifolia*, aunque todos han tenido el objetivo común de evaluar la diferenciación genética entre los biotipos reportados.

En los estudios de Marulanda et al. (2002) mediante AFLPs y Marulanda et al. (2007) con sistemas microsatélites de arroz y caña de azúcar, respectivamente, encontraron una diversidad genética no significativa para la guadua en el eje cafetero y no lograron caracterizar molecularmente los biotipos, mientras que en el estudio de Pérez – Galindo et al. (2009) mediante microsatélites diseñados específicamente para *G. angustifolia*, se encontró una diversidad genética significativa en las accesiones ubicadas en el Banco de Germoplasma, reportándose una correlación entre la distancias genéticas de las accesiones y las distancias geográficas de las mismas, planteando una posible diferenciación genética a nivel geográfico, sin embargo, tampoco se reportó una diferenciación genética entre los biotipos.

A diferencia de los AFLPs, los microsatélites, secuencias de no más de seis pares de bases de largo repetidas en tándem (Goldstein & Schlötterer 1999), son altamente polimórficos y de herencia codominante (Parker et al. 1998, Chambers & MacAvoy 2000), por lo que son muy utilizados en la identificación y seguimiento de individuos, en estudios de asignación de parentales (Castro et al. 2006), en análisis de pedigrí, en estudios de dispersión de plantas (Ouborg et al. 1999), en sistemas de reproducción (Young & Hammock 2007), en flujo génico y migración, en introgresiones, en fitogeografía, diversidad genética, en el estudio de la estructura de las poblaciones (Wilson & Provan 2003) y en la caracterización de variedades o cultivares facilitando su identificación y selección (Frankhan et al. 2002, Chambers & MacAvoy 2000).

Por otra parte, en el estudio de Potosí et al. (2006) mediante RAPD, encontraron una alta diversidad genética en los relictos naturales de la cuenca Cauca, y a su vez, lograron caracterizar y diferenciar genéticamente los biotipos. Debido a los resultados contrastantes de estos estudios se hace más enfático profundizar en esta área de la biología de *G. angustifolia* y al mismo tiempo resulta conveniente llevar a cabo la evaluación de la diversidad genética en el Valle del Cauca y como esta puede estar posiblemente correlacionada con variables eco geográficas, ya que hasta el momento se cuenta con este conocimiento en los departamentos del Cauca, Quindío, Caldas y Risaralda.

En este estudio se realizó por primera vez la estimación de la diversidad genética en los relictos naturales de *G. angustifolia* en el Valle del Cauca mediante marcadores microsatélites (SSR) diseñados específicamente para la especie, siendo los primeros en ser reportados en el GenBank (Pérez-Galindo et al. 2009). Este conocimiento permitirá un mejor establecimiento, planteamiento y ejecución de medidas de conservación viables para *G. angustifolia*, así como la base para los programas de fitomejoramiento de la misma.

El problema del agotamiento del recurso guaduelero se ha denunciado desde hace mucho tiempo por diferentes organismos nacionales. Sin embargo, hace poco tiempo que la guadua viene siendo tratada como objeto de investigación. Entidades estatales y grupos privados se han encargado de recuperar la guadua con diversos fines. Las corporaciones regionales, se ocupan de la producción, manejo técnico y silvicultura, recuperación, promoción, difusión y control. A pesar que se reconoce a Colombia internacionalmente como país pionero en sistemas constructivos con bambú, la falta de materia prima uniforme y de buena calidad, que garantice la durabilidad de las construcciones en el tiempo, es una desventaja que afronta el sector de la construcción y la cadena de la guadua en Colombia. Se ha propuesto que estas variaciones en la calidad de los materiales pueden deberse al componente genético de los materiales utilizados (Muñoz y Londoño 2011).

Un factor importante para la conservación de poblaciones naturales de cualquier especie es el entendimiento de su estructura genética, lo cual se convierte en una herramienta básica para la planificación estratégica de su conservación y uso sostenible (Romero et al. 2008). La estructura genética de las poblaciones hace referencia a la distribución específica de alelos o genes para una población o grupo en particular. En Colombia se han realizado estudios de diversidad de bambúes (Londoño 1990) y estudios con marcadores moleculares (Marulanda et al. 2002; Marulanda et al. 2007; Potosí et al. 2006) de la especie *Guadua angustifolia* pero no se han relacionado con características de calidad para los diferentes sectores de la cadena productiva, además, los resultados encontrados han sido contrastantes, indicando baja diversidad en los bancos de germoplasma y alta diversidad en poblaciones naturales.

La tala indiscriminada y explotación indebida de los guaduales ha generado una rápida pérdida de este recurso genético, además, la falta de estudios de diversidad genética en la especie plantea la necesidad de caracterizar morfológica y molecularmente poblaciones de *Guadua angustifolia* en el eje cafetero Colombiano para el mantenimiento de la especie como recurso biológico, genético y con potencial de uso industrial. De esta manera, el programa “Mejoramiento de la productividad de *Guadua angustifolia* Kunth mediante la selección de materiales superiores y de la optimización del manejo silvicultural, para la obtención de materia prima de calidad: una contribución para el fortalecimiento de la competitividad de la cadena productiva con énfasis en el sector de la construcción”, financiado por el Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural y coordinado por la Universidad Nacional de Colombia (Muñoz y Londoño 2011, Muñoz 2011), a través del proyecto “Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero”, planteó la selección de materiales superiores y la evaluación de la diversidad genética, haciendo necesaria la realización de esta investigación como parte fundamental para el cumplimiento y desarrollo de las actividades planteadas.

*Guadua angustifolia* sobresale dentro del género no solo por sus propiedades físico mecánicas sino por el tamaño de sus culmos (Sánchez et al. 2010). Ha sido seleccionada como una de las veinte mejores especies de bambúes del mundo, ya que su capacidad para absorber energía y admitir una mayor flexión, la convierten en un material ideal para construcciones sismo-resistentes, sin embargo, en los últimos dos siglos, se redujo ostensiblemente la extensión de guaduales en el país, pasando de doce millones de hectáreas a solo cincuenta mil (Agudelo y Toro 1994).

La disminución de la población original de guadua en el Eje Cafetero Colombiano y en el Valle del Cauca, se debe al avance de la agricultura de ladera, en especial a la consolidación del cultivo del café. Durante la colonización se utilizaron los guaduales como leña para hornos y como elemento maderero, haciendo vulnerables de desaparición a los guaduales naturales con el continuo crecimiento y expansión demográfica en el eje cafetero. La mayoría de las fincas ubicadas entre 1000 y 1500 msnm en el eje cafetero, han perdido su selva nativa y solamente se observan los guaduales ubicados generalmente a orilla de quebradas y ríos, los cuales sirven como refugio de la fauna local. Estos guaduales son ecosistemas que albergan más de 120 especies de plantas, 48 especies de aves, 20 especies de mamíferos y siete especies de reptiles (Londoño 2004).

Únicamente, *Guadua angustifolia* ha tenido una apropiación cultural, un desarrollo tecnológico y una importancia económica local en el país. Sin embargo, los guaduales se han visto afectados en los últimos años por la tala indiscriminada y la destrucción de los bosques (Judziewicz et al. 1999), lo cual repercute directamente en la pérdida de recursos genéticos que aún permanecen desconocidos y que pueden ser de gran importancia en programas de manejo y mejoramiento de estas especies con valor comercial. Por otro lado, conocer los patrones de distribución de la variación genética en recursos genéticos vegetales debe convertirse en objetivo primordial de las instituciones que realizan investigación. En estas especies, la variación se toma como el punto de partida para hacer mejoramiento genético por selección en características deseables no solo desde el punto de vista agronómico y nutricional sino también de la aceptación por los productores, para quienes estas

especies tienen diferentes valores de uso (Stewart 1999). Estudios internacionales sobre bambúes plantean la necesidad de conocer la diversidad genética del recurso, establecer las bases para la conservación y el uso sostenible a través de la investigación, además, desarrollar estrategias complementarias de conservación para el uso de estos recursos genéticos (Rao y Rao 2000).

En este estudio se diseñaron y evaluaron marcadores microsatélites específicos para *Guadua angustifolia* con el objetivo de estimar la diversidad genética existente de *Guadua angustifolia* en el departamento del Valle del Cauca – Colombia. Para ello, se estandarizaron las condiciones de amplificación de 26 secuencias microsatélites aisladas para *G. angustifolia*, se evaluó su contenido informativo polimórfico y se seleccionaron aquellos con el mayor porcentaje de información. Con los microsatélites seleccionados se determinaron los parámetros de diversidad genética y estructura poblacional en muestras de plantas de *Guadua angustifolia* de veintidós localidades distribuidas a lo largo del Departamento del Valle del Cauca analizadas. Además, se correlacionaron los resultados obtenidos con la información de ubicación geográfica dada por la procedencia de las muestras

### **3.2. Materiales y Métodos**

#### **3.2.1. Colecta del Material Vegetal**

Se colectaron hojas jóvenes y en buen estado de 92 individuos de 39 guaduales colectados a través del Valle del Cauca. De cada guadual se muestrearon en promedio tres individuos localizados a una distancia de 5 metros uno del otro. Para cada guadual se anotó la altura en que se encontraba sobre el nivel del mar (tabla 1). El tejido foliar fue depositado en bolsas de papel almacenadas inmediatamente en tarros plásticos llenos de sílica gel con indicador de cobalto, para deshidratar el tejido. Las hojas colectadas se maceraron finamente en morteros empleando nitrógeno líquido. El macerado se conservó a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

### **3.2.2. Estandarización del protocolo de extracción de ADN de *Guadua angustifolia***

Para extraer el ADN de *G. angustifolia*, se evaluaron tres protocolos con 10 accesiones, con el fin de determinar cual permitiría una extracción limpia y de alta concentración del ADN. Los protocolos analizados fueron los siguientes:

1. Kit de extracción de ADN de Quiagen (Dneasy Plant Mini Kit).
2. Protocolo de Micro extracción de ADN Dellaporta (1983) con modificaciones para arroz y posteriormente, modificado para *G. angustifolia* por Potosí et al. (2006), con nuevas modificaciones en este trabajo.
3. Protocolo de extracción de hojas frescas de Cucurbita (Brown & Myers 1998) modificado a tubos de 1.5ml y tejido seco.

La evaluación del ADN se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8 %, teñidos con bromuro de etidio, cargando 2ul de ADN y 2ul de buffer blue juice, a 48 voltios por 30 minutos; se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Fotodyne Inc). La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro multifuncional Genius TECAN, Austria, a 260 nm y en geles de agarosa mediante comparación con ADN lambda.

### **3.2.3. Extracción y cuantificación del ADN**

El ADN se extrajo mediante el protocolo de micro extracción de Dellaporta (1983) con modificaciones para arroz y posteriormente, modificado para *G. angustifolia* por Potosí et al. (2006, Anexo 1). La evaluación se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8 %, teñidos con bromuro de etidio, cargando 2ul de ADN y 2ul de buffer blue juice, a 48 voltios por 30 minutos; se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Fotodyne Inc). La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro multifuncional Genius TECAN, Austria, a 260 nm y en geles de agarosa mediante comparación con ADN lambda (Invitrogen).

Tabla 3.1. Muestras de *Guadua angustifolia* colectadas en diferentes localidades del Valle del Cauca.

No. Muestra	Código de la Muestra	Forma	Localidad
1	Bicolor 43	Bicolor	Tuluá
2	XL 124	Nigra	Tuluá
3	Bicolor42	Bicolor	Tuluá
4	JA 1023	Cebolla	El Cairo
5	JA 1049	Cebolla	Tuluá
6	JA 1038	Macana	Sevilla
7	JA 1039_2	Cebolla	Sevilla
8	JA 1038_1	Macana	Sevilla
9	JA 1047_1	Macana	Buga
10	JA 1048	Macana	Tuluá
11	JA 1035_ 1	Castilla	El Cerrito
12	JA 1046_1	Macana	Rio Frio
13	JA 1040	Cebolla	Buga La grande
14	JA 1056	Cebolla	Cali
15	JA 1055	Cebolla	Jamundí
16	JA 1051_2	Macana	Jamundí
17	JA 1052_1	Macana	Jamundí
18	JA 1056B	Macana	Cali
19	JA 1059_1	Cebolla	Alcalá
20	JA 1060_1	Bicolor	Tuluá
21	JA 1061	Cebolla	Restrepo
22	JA 1062_2	Bicolor	Vijes
23	JA 1063	Cotuda	Restrepo
24	JA 1064	Bicolor	Buga



### 3.2.4. La clonación y el aislamiento de clones microsatélites.

Muestras de hojas de una población colombiana se recogen y se secan en bolsas con silica gel - cobalto, Las soluciones de todos los cebadores incluyendo las seis versiones marcadas con Fam se dividieron en dos grupos (indicado con \*). La primera serie correspondió a *Bambu sp.* y la segunda a *Guadua Angustifolia*. Los ADN genómicos de 13 individuos por especie fueron extraídos y evaluados. Para la primera especie fue usado el individuo 1-1 como material de referencia y para la especie 2 el individuo 2-1. Los ADN genómicos de 13 individuos por especie fueron extraídos utilizando el kit Qiagen DNeasy.

Para la primera especie fue usado el individuo 1-1 como material de referencia y para la especie 2 el individuo 2-1. 26 ADN de un individuo se utilizó como una fuente de clones genómicos para preparar y enriquecer marcadores GATA tetranucleótidos en *G. angustifolia*. A continuación se hizo una doble digestión con las enzimas de restricción HPSH A1 y Hae III y ligadura con M28/M29p:

(M28 5' CTCTTGCTT**GAATTC**GGACTA

M29p 5' pTAGTCC**GAATTC**AAGCAAGAGCACA)

El DNA ligado se desnaturalizó y se hibridó con 5' biotina GATA6 (a 50 ° C), seguido del aislamiento con Dynal M270 29 beads. La amplificación se llevó a cabo con los cebadores M28/M29p. Después de la amplificación, los fragmentos enriquecidos se clonaron mediante digestión con EcoRI y ligación con EcoRI desfosforada y tratada con pUC19, seguido por electroforación dentro de *E. coli* DH10B. Para los fines de detección, las colonias se colocaron con 5'<sup>32</sup>P-GATA6 a 50°C (0.75 M NaCl, 57.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, pH 7.4) y luego fueron lavadas con 5XSSPE a la misma temperatura.

Se secuenció un conjunto de 24 clones GATA positivos y se probaron diez pares de cebadores. Las secuencias se obtuvieron mediante la amplificación de una alícuota de cultivo bacteriano congelado con colonias positivas para la hibridación de 32-P

GATA6. Las reacciones de amplificación fueron tratadas con exonucleasa I y fosfatasa alcalina para eliminar el exceso de cebadores y desoxinucleótidos trifosfato no incorporados. Después de la desactivación con calor, aproximadamente 10 ng de producto de PCR fue secuenciado utilizando los cebadores M13 hacia adelante (F) y hacia atrás (R), en un secuenciador Applied Biosystems Big Dye V3.1 ABI3730 (University of British Columbia, NAPS service, Debbie Adams, manager).

El primer conjunto de cebadores es el siguiente:

Bam 1R	TTGGTCACCGCATTGTGCTTAG
Bam 1F	AGGAGTTTCGTACAACCTTCGTG*
Bam 3R	ATAACTTAGACCTGCTCGATAG
Bam 3F	TCACTCTGAGGAAGCTCTCATG
Bam 5R	GGCCATGAACTAGATAGATA
Bam 5F	TGCTCTCCTAGAAGTACTGA
Bam 6R	AGAAGAATCGACATATCTGATCG
Bam 6F	GAATTCGCGTGGAATTGAGCTAG
Bam 8R	GTGATTTTCGTTTCGTTACTCTGG
Bam 8F	TAATCACGACCTACGTTTCATG
Bam 11R	GGTCTCCTTTTCTATTGCAGC
Bam 11F	ATTCGATCATCGTGCATGATGC
Bam 14R	AAGTATTCCAATGTCGTGACTC
Bam 14F	CGGTACAGGACAAATGGGCAAC
Bam 15R	AGATCGAATTGAGACGCATGCA
Bam 15F	AAAAGTCAGTGGTGGCATCGA
Bam 17F	GGTGCTTATAAGTATACTGTCCA

Bam 17R TCTTCGGGCATGAGCTAGTTGGCTA

Bam 22R GTGTAGCTAATGAGTATGCTG

Bam 22F GTGACTCTCTGAACGATCTATG

Los siguientes cebadores aún no han sido evaluados:

Bam 4-2R CCTTGCGATTATAATGGCTTG

Bam 4-2F CACTCAGGGTTAACATGGTG

Bam 9-2R CCTAGCATCAATTGCAACTCAG

Bam 9-2F GATTATTGCTTATTCCTGGTCAG

Bam11-2R AAAAGCAAAGAGAAGCCAAGTC

Bam11-2F AGCATTGAGCATAAGCATGTTC

Bam16-2R CATGCAATCGAGTGCTACGTAG

Bam16-2F GTGCATTCCCTATCTATCTACAAAG

Bam17-2R CTTGACCTATAGAGCTGTGATC

Bam17-2F TTCTTGCCATACTAGTTGTGTC

La segunda serie de cebadores es la siguiente:

Bam2-3R GTTCCTACATGTAGACATATCC

Bam2-3F CTCTTGGGAGTGAGCATGGTGAC\*

Bam2-2R CGCCACGTTAATCCCAGTTAGG\*

Bam2-2F CCTATACATATATGCATTGTGTGG

(This pair amplifies the same locus as Bam2-7FR)

Bam2-1R GTCAATCACGCCAGCTCTAACA

Bam2-1F CTCTGACATGTATGGATCTTGCA\*

Bam2-5R CTAGATCTTCCTAATCAAAGTGG\*

Bam2-5F TACTAACCGATTGTCCCGTCTAG

Bam2-6R CCCGACAGATAGATGGTCAAA

Bam2-6F CTCATTTCTCAATTGCGCAAGAG\*

Bam2-7R CTACTAATTGGAGGCTCCTTCAG

Bam2-7F GTCGTATCATAATCGGCTTTAAGAG

(same as 2-2FR)

Bam2-11RGGCGGTTATTCTATTTTTATCC

Bam2-11F TACCCAATACCCTTGCCTGTC

Bam2-8R CCCAACAAAGATGGTCAGAT\*

Bam2-8F CAGGAGATGAGCCTGTTAGT

bam2-4R CTAGGCCCACTCCTATCCCA

bam2-4F AGCTTCCTCAGAATGCCTAATTA\*

bam2-12R CCTTCAATTAGTACATAGATAG\*

bam2-12F GTACAGAACCATCTCATCCT

bam2-13R CCTTCACATGGTCTCACAAG

bam2-13F CAGTCTAGCAATCAATTTGAAG\*

Las parejas de cebadores anteriores se utilizaron para amplificar los DNAs genómicos de los individuos 6 al 12. Los productos de PCR fueron fraccionados y etiquetados con  $^{32}\text{P}$  sobre geles 6% geles de poliacrilamida denaturante, seguida por autorradiografía. Todas las amplificaciones se realizaron a un volumen el 12,5  $\mu\text{l}$  (1X UltraTherm buffer, 1.5 mM  $\text{MgCl}_2$ , 0.2 mM para cada dNTP (excepto para el marcaje donde el dATP frío es 20 mM), 0,5 mM para cada cebador, 0,05 unidades de polimerasa de ADN Ultratherm (Medicorp) y 0,0125 unidades de ventilación ADN polimerasa (New England Biolabs). Las condiciones típicas de PCR fueron: 95 ° C, 3 minutos y luego 33-35 X 30 (95°C 30 segundos/ 55°C 30 segundos / 72°C 1 minuto y 30 segundos) y 72°C, a 5 minutos, todos en MJ Research PTC-100 termociclador. A continuación se muestra cada clon obtenido, ya sea con uno o ambos M13 (R o F) Sólo para los primeros clones se registraron:

- 1) el sitio de clonación EcoRI se muestra en negrita y subrayadas las secuencias del adaptador,
- 2) las regiones SSR GATA / CTAT se muestran en negrita y cursiva
- 3) los sitios de unión están subrayados.

De cada clon de la que fueron diseñados se muestran a continuación las secuencias de avance y retroceso de los cebadores.

### **Conjunto uno de cebadores**

## Bam1R

NNNNNNNNNNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC**GAATTC**TTTTTGGTCACCGCATTGTGCTTAGA  
TGAACAATAT**CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT**AGAT  
TTGAGGCTCTTTCTCCAGATCCATCTTACACCACGTAAGCTTAAGCTCTCATGTACGG  
ATAGGGTGCACGCAGAGGAGTCGTCCTCCCTGTTCTCG**CACGAAGTTGTACGAAACT**  
**CCTTTTCACCGTTCCCCCTCTCTCTCTCTCTCTGTCAAGAAAAAGACGATTTGTGCA**  
GGAAGTTGTGTGATCCTTCGCAAGGTGGACCCTGATCGGATGGTAGTCCGAATTCGC  
CCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCACCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGN  
NNNCNCTGGNGACNNNANANGNNGACACGAATTNNTGCTAAATATTTGTATNATTC  
GGACGACNGTCNATGAGGGGGGGGCCAACGNANGANCCAANTTTNNNAGNATTCTT  
GNTTTNACNNGAAGAANNNTTCTTGTGAGGAGTANCAGTCNGNANANGNNNNNNNN  
ACNNTGCNANGGNAAAGNCGNACGANNCNGAGTNTNCATCTNTATCNGAGCTG  
GATGGNAGATGANGTNGANGGANCGATGGATATAG

**Bam 1R TTGGTCACCGCATTGTGCTTAG**

**Bam 1F AGGAGTTTCGTACAACCTTCGTG**

## Bam 2R

GNNNNNNNNNNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC**GAATTCGGACTACCCCATAGTCCTGAACCAATC**  
CTAGCATCAGACCGCCACCTCAGCCTCAATGTGTGTGCTAAGTCATCACCACCTCGGT  
GCCCACCTAGCAATCACTCGAACCTAGATCTGTTTGTTCTCTCAGTCGCACGTGGGT  
CCACATGTCAGCCTCTCCTATTTTTAAAAAATCTAGAAAATAAAAAATTCTTTGATCCCA  
CTTGTCAGCCACTATTTTCTCTCTCATCGATTTATTTCCCATACTTCTCTGCGAATACA  
ACTTCTAGCAAGTCATTGTCTCTTGCCCGTCATTCTTATCTCTAAATTCATCTAAAATCA  
AACTCTACCTTCCAATACATTTATTTTGCAATTTGGAGTTTATTTGAATGTTTTTTGTAC  
TTGCACTTTCTCGCTCATTAGACATTGACATTTTGGGGTCATTGGAAGTAGATGGAGA  
ACAAGGAAGACAAAGAGTGGGGAATAGCAGCCTTGTGTGTTGTTTTATAAACTATTT  
TACTTTCAAATTATTGTGCATTGCTTGTTGCTATCAATGTTAAATTACTTGGGTAATAAC  
TATAAATTATAGTTGTTTGTCCACCTTGATCTTCGTATGCCATGAATTATAGACTTCCC  
TAGAGCCTCCGGTAGCACAGTCGAGATAGCGATGGGTTCTCCACCCATATAGGGATG  
GAGCAAAAGAAGTATGGAAAGCGACAGAAGTATGGAAACTGATAAGGTAGCGGTGAG  
ATGAGTTGTTTAAATAGGTGTAAGTGGAAGTGATGTATGCAGCTAAGGCATCC  
TAACGGACAAACGATTTAAACCTTATTCCTACATGACTTGATCAAATTGATCAAACACT  
TGCCATCTATCTTCATTGTTCAACTCTTTGATGAAAAGATGAAAAACCAAAAAAGCTCT  
GCCATTCCATCTCTCGATAGATAGATNGATNGATNGATNGATNGATAGATNGATAGNT  
NGNNNGNTNGATNGNTNGNNNGNTNGNNNGNTNGNNNGNNNGATNNN

## Bam2F

[illegible]

## Bam3R

NNNNNNNNNNNGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCGGCAGGAACGTCAGGATC  
CAGCGGCAAACGCATGGACGCTGCTTGCGGGGCTCTGAAAGTTCTGGCGGATGCCG  
GGGGAACATAAACCAAACGACCTCGACTCGACAGAGAACAAAGGACGCAAGGGAGCT  
TGGGAGGAATTTTTTCTCGATATGCGGAACATTAGACGCCATACAAAGAAAAATCC  
ATCCGATTACTTGCATGCGGGATTAAAGTATCTCCTTCGTTTTCTCCTTGAGTAGCATG  
CATGCCTTAATTGGCTCCTTCCTTTCTCCTTGCCTAAGTATCTTCTATCTTGATTTCC  
GGATGCATGATTTTCCTTGCATGCATGTAATTCTATACGACACTTCTATTGGGACTTTT  
CTATTTCCATCCAACCTTCCTCATAATTATCTAGAGTCGATCTAAACTGTTATAACTTAGA  
CCCGCTAGATAGATAGATGACTAGATCTTCTAATTAATGTGGGAGCTATCAATTTGA  
GCCATTATAATTTAGACTCGCTAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATCATTCTGATTAAACATGGGAGCTTTCTCAGAGTGCTTAATTATTATATCATAGTTAT  
CTAGAGTCGATCCGAGCCGTTATAACTTAGACCTGCTCGATAGATAGATGACTAGATC  
TTTCTAATTAACATGGGAGCTATCAATTTGAGCCATTATAATTTAGACTAGCTAG**GATAG**  
**ATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATGACTAGATCTT**  
**TTCTAATTAAC**CATGAGAGCTTCCTCAGAGTGACTAATTATTATAAAATATAGATAGATAT  
AGATCGCCCGGAAGTTACTTTTGTAAC TNACAAAAAAGTGTGNAAAGAAACCAGCCCG  
TCANAAGATTCAAGTTTACTCTTNTTCTTTCATGNAGCCAATGTACGTAGCTNTTTTTTC  
NGNAGNCCGAATCCCCCTATAGTGAGTCNNANTACANN

**Bam**  
**3R      ATAACCTTAGACCTGCTCGATAG**

**Bam 3F   TCACTCTGAGGAAGCTCTCATG**

**Bam5R**

GNNNNNNNNNGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC**GAATTC**GGACTACCATGACTTGCTGTGATGTGA  
GAATCTCTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATACTAATTAGA  
GGCTTTTAAAGGGTCTAGACAATGATAGAATAATCCTCATAATTATTACGTCATTATAT  
ATCTTGAGTATACCATTTATCAATAAGGGAGTAAGTTTATGGAAAAGTTGTAAGCTTTT  
CTACGATCATTCCCTTAGTCGTAAGCTCTCCTACGACAAAATAATTGTAAATCCTTCTAC  
GACTATATAGCCGTAAGTCCTTCTACGACCACAAAGTCATAAGTGATCCTATGATCAC  
CTCATGGTCGTGGACTATTCTACGACTACCCTATCTACAATCGACTTGTCTAACAGCG  
TCCTACTACATCATGGGGGCGTCTGACAAGACGATTAGAATGTGTGATTATCTAATAA  
CCATACACGATCTCTCCCTGACACTAACCGCTGCACGACGAACGGTAGTCCGAATTC  
GGACTACCATGAAGTAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGA  
TAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGAGAAGAATCATTCTGAGCAAGTTT  
CTCCTCTTTACTCGGTTAGGATTAACATCAGTACTTCTAGGAGAGCATCTGATATTTGA  
TTTGTATATATGTACATATATAGACTCGGATAATTTTTTAAAATTATTGTTCAAAAATTGT  
AAAGTTGAAGACCTGAAAAATATAAACTTTAGTTCATCTAGTTTTGATGGCAAATTTAC  
TTACAATTGGATAACACAATTTTAGATCAAAAAATTAAATTTGTGCGTGTTTTGAATAAN  
ATAAAATTATATATTT**GAATTC**GCCCTATAGTGAGTCNNNNTACAATTCAGTGGCCGTC  
GTTTACNAC



**Bam 5R GGCCATGAACTAGATAGATA**

**Bam 5F TGCTCTCCTAGAAGTACTGA**

#### **Bam6R**

NNNNNNNNNNNTNGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT  
CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCTTGCTTGTAATATCTCTC  
ATTTCTGTATTGTTTCCCAATGTTCCAACGAGAACAACGATACAATAAACTTATTTTTTG  
CCGCAAAAAGAGAAAAACAAATAAGATACAAGAAGCATGGTACAGGGAATGCCTGCAA  
GCACATGATCGATGGGTGAAAAGGTGCACTACACCATTATTTCCACAAAAGAAGAATC  
GACATATCTGATCGTAAAGATTAATACCAACCTATATCGATGTCCATCGATCATGCCCA  
TTAAATTGTTGCCTTGCTTTGGTCCATCAACGCCGTCTGTTTCTCTATCTATCTATCTA  
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
CTAGCTCAATTCACGCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCG  
TCGTTTTACAACGTCGTGACTGGNANNNNNCCNNGNANNNNNNNNNCANTTTTNNTTA  
NNCCACTCTNNGTGGAACCAATTCGTTTGAAATCGAGCTAGAGAGNNNATCGATAAATA  
GATANATCGATAGATAGATCGATCGATCGATNGATTGATAGATAGATAGATAGATAGA  
CAAACAGACGGAGTTGATGGANCAAAGCAATGCANCANTANAGGGGNAATAANATNG  
ANGGNANANNNNATAGANATTAANCTGAAAAANNAATATGCNANNCTCCTATNNNNNA  
ATATNGNNGTANGGAACNATTNNACNAAN

**Bam  
6R AGAAGAATCGACATATCTGATCG**

**Bam 6F GAATTCGCGTGGAATTGAGCTAG**

#### **Bam8R**

NNNNNNNNNNNAGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCCTCGATGAATGATACATCCTCCTTGAT  
GATATCCATGGAGACCAAGCGTGGGTGAGAAAACTAGCTGGTGATTTTCGTTTCGTT  
ACTCTGGCTTTAGTCATCATGTATTTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
CTATCTATATACACACACACACATACACACAAAAGCAATAAGTTATATATGACATTTAT  
CAGTATTACATGAACGTAGGTCGTGATTATAAACACTTACAGCGTCCAGCATCGAGTG  
AGTGAGTCATCAAGGGCATTGAGTGTGAAGAGAAATAATAAGTCCTCGAAGATCACTG  
TGAAGACACAGTCATGAATATTGTGATGAAGATGATCTGGCGCGAACTTGACGGTAAC  
ACCCGAGCGCCGTTGTTCTCTTCCATGTACCATGCATATAATCTCTAGCAAGCCAAT  
CCTAAGGTTAAGAGGCACTATTTTGGGACTACCAATGGCTCGCCTAGCACGAATTTTT  
TTGGGTCAACGGTAAGTAGTGGATCTCATCATCGGTCTTCTTCGGTTTGCTTGGCACC  
TCGGATGTAGGTCGACTTCACAGTAGTCGATCGGGCACAAGATGTAGATGCACCATG  
CCCGGTGCAGGAAGCTCCGGTGTGGATAGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTC  
GTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCNNNNN

**Bam**  
**8R**        **GTGATTTGTTTTGTTACTCTGG**

**Bam 8F**   **TAATCACGACCTACGTTCATG**

### **Bam9R**

GNNNNNNNNTNGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGCGTGGAATTGAGCTAGATAGATAGAT  
AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAG  
ATAGATAGAGAAACAGACGGCGTTGATGGACCAAAGCAAGGCAACAATTTAATGGGC  
ATGATCGATGGACATCGATATAGGTTGGTATTAATCTTTACGATCAGATATGTCGATTC  
TTCTTTTGTGGAAATAATGGTGTAGTGCACCTTTTCACCCATCGATCATGTGCTTGCA  
GGCATTCCCTGTACCATGTTTCTTGATCTTATTTGTTTTCTTTTTGCGGCAAAAAAT  
AAGTTTATTGTATCGTTGTTCTCGTTGGAACATTGGGAAACAATACAGAAATGAGAGC  
GCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG  
NNNANNNCNGNNGANNANANTANCGNTANNNNNTGNGACTCACTATTGGGCGCTCT  
CACTACAGGGTGGGCTCCCGNTGCTCCNGCACCACAGGTNCNATAAACTTATTTTTT  
TTGCTNNANNTTTANNTCCNNNNAAANACAANAANCNTGGNATACGNAATGCCGGCA  
ANNNNANTGCCNGGNGTAAAAAAGGTGNNNNNANATANNNTGCAAGAANAATATNCC  
NATCCNATGGNANGATTANNACCACNAGGTGGAANCCANCNATNGCCATTAAATGNN  
NGNNTNTNTNGNNNNCCAGCCNNCGGNTCNCANNGCAC

### **Bam11R**

GNNNNNNNNNNTNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCGAACAAAATTTGCTAAAC  
TATTGCCACTTCCAAGCTCGCTCCAACAGTTTTAGTGATAGACGCGACAGTGTGGAG  
TCGATCTTTCTACTCCATCGACACTCCTGTGCACATGCAATTTCAATGTCTGAGGCTTA  
ACCCCATGCACTAATCTGACACTTATTACTGTTTCATATGTAACCTGTAACCAGGAAATT  
GCAAAGTAGTAACAGTATCTCAAGTAATTGCAAACCTTGTATATCATGAGTAGTTGAGG  
CGATTGTTTGGATCCATTCCAAGCAAACAACCACCACAGATTGCGGTGTGAACTACTC  
ACAGACATGCATGATGCAGTCAGATCATCCTGATATATAGAACCTTTTTGCGGTCTCCT  
TTTCTATTGCAGCAACAGTTGTTTCCGCGTTCTTATCCCAAGATATAAACTCCACTTC  
CCAGTTTTCTTATCGGCTGTTAAGCTTTTGTCAAACAATGGAGTTTTCTATCTATCTAT  
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCTGTCCGT  
CTGTCTGTCTATCTGGGGCAGAACGCTGCGTGATGGCTGTCATGCCATGCCAGGCC  
GCCTGATAATAATTGCATCATGCACGATGATCGAATGCACAATCCGTCTCTAGCTACT  
CTAGCTTCGTGTGGTGGAAATGGGCAGTATCTCTGTATTTTCGATGTGGCATGCGACGA  
CAGGATGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTC  
GTTTTACAACGTCNNNNGNNAANNCCCNGNNGGGG

**Bam 11R**      **GGTCTCCTTTTCTATTGCAGC**

**Bam 11F**      **ATTCGATCATCGTGCATGATGC**

#### **Bam14R**

GNNNNNNTNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCTCAGTCTCTTCCTGTCGCC  
TCCTCCAGAACTCCACCACTCTTTGTTGCAACATCGGCACTGCTGCCCTCGGCAATGT  
ACAAGCATCCCAAGGATGCATCATTCCGTCCTTCTCTAGCTCCGACTGATTTACCTAG  
ATATCATGCGTGTCCACACTTAATTACCACTTGCTCCTGAGTTTTTTGGTTTAAAAATT  
ACAATTGATTGAATCAACAACATCTTCTTTCTCCCCATCCAGGACAAAGTTATATATA  
TACTTTACGGACGGACTTGCTTTCTCAAAGTGTGATTGATTACTTGCAACACAATAAC  
ATCATAGAAACAAATTAACACGCACTATACCGTGCCCCTGTATAAACTACTTATGAGA  
ACGATAAGAATAGATGCATTACCTACTTCGATTTCAACTCTCAAAGTACTACTATAATC  
GCTGATCAACTAACTGGGTGATGCGAGGATGAACACCAGCAGCAGGCAGGGTGGTT  
TATATAGGACCCAAGGGGGGTCAGAATTTCTATGGGAGCCGAATGTAATGCTCAATA  
GGAAATTTTCAAGAAACAATAAAGCTTGCAGGTGCTCATTGATTTCTTGTGGGTTTGT  
GTTGTTTTTTAGCTTTTCATGCATCTTTTTTATTGTTTTATTGAAACGGCTTTGGACCACA  
CATGGTTCAACCATCCATCCTAGTGCTAAAAACAATCCAAGTATTCCAATGTCGTGAC  
TCATTCACGCATGAGTGACGCCTAATGATGCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
CTATCTATCTATCTATCTATCTACACCTTCAATTTGGTTGAATCCTTCAGCTGTTGC  
CCATTTGTCCTGTACCGTCCCTCTCTCTCATTCTTATATACTAATGGACAGTTACTTAG  
GTGTATTTTNTGCTTTTGGGTAGTGNATCATATATCCTGGATANNGGAAGCTGGATG  
AGGANGGTAGTCCGAATCCCCCTN

#### **Bam14F**

NNNNNNNNCENNNTAGGGNNNNNCGGACTACCCTCCTCATCCAGCTTCCCCTTATCCA  
GGATATATGATCCCACTACCCAAAAGCAACAAAATACACCCTAAGTAACTGTCCATTA  
GTATATAAGAATGAGAGAGAGGGACGGTACAGGACAAATGGGCAACAGCTGAAGGAT  
TCAACCAAATTGAAGGTGTAGAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATAGATAGATAGCATCATTAGGCGTGCCTCATGCGTGAATGAGTCACGACATTGG  
AATACTTGGATTGTTTTTAGCACTAGGATGGATGGTTGAACCATGTGTGGTCCAAAGC  
CGTTTCAATAAAACAATGAAAAAGATGCATGAAAGCTAAAAACAACAACAAACCCAC  
AAGAAATCAATGAGCACCTGCAAGCTTTATTGTTTCTTGAAAATTTCTATTGAGCATT  
ACATTCGGCTCCCATAGAAATTCTGACCCCCCTTGGGTCCTATATAAACCAACCCTGCC  
TGCTGCTGGTGTTCATCCTCGCATCACCCAGTTAGTTGATCAGCGATTATAGTAGTAC  
TTTGAGAGTTGAAATCGAAGTAGGTAATGCATCTATTCTTATCGTTCTCATAAGTAGTT  
TATACAGGGGGCACGGTATAGTGCGTAGTTAATTTGTTTCTATGATGTTATTGTGTTGCA  
AGTAATCGAATCACACTTTGAGAAAGCAAGTCCGTCCGTAAAGTATATATATACTTTG

TCCTGGATGGGGAGAAAGAAGATGTTGTTGATTCAATCAATTGTTAATTTTTAAACCAA  
AAAACCTCAGGAGCAAGTGGTAATTAAGTGTGGACACGCATGATATCTAGGTAAATCAG  
TCGGAGCTAGAGAAGGACGGAATGATGCATCCTTGGGATGCTTGTACATTGCCGAGG  
GCAGCAGTGCCGATGTTGCAACAAAGAGTGGTGGAGTTCTGGAGGAGGCGACAGGA  
AGAGACTGNNTAGTCCNAATTGAGCTCGGTACCCGGGGATCCTCTAGAGTCNACCT  
GCNNNATGCAAGCTTGAGTATTCTATAGTGTCTNNCTAAATAGCTGGCGTATCAN

**Bam 14R    AAGTATTCCAATGTCGTGACTC**

**Bam 14F    CGGTACAGGACAAATGGGCAAC**

**Bam15R**

NNNNNNNNNTNNNGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTGCGACTACCCCTTGTTTTTTAGGGGGG  
AGAGGGAGAATTTATGACCATTAGATCTTTAATCTAACAGTTCTAAATCTAGATGATAG  
TTAGGAAGAAAACATCCGGATGATGTTTAACAAAAACCTAAAGAGGAAAAAAGAACAA  
AGAGTATATATTTATGAAAGAGATCGAATTGAGACGCATGCAGGAAGCTATGGGGTGT  
GTGTGTATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATGGATGG  
ATAGACAGATAGATAGCATCAGCAAGTCTCAAGGACATGCATACATATATTAGATAGA  
GAAAATTTGATCGATGCCACCACTGACTTTTTTTTAGAGAACATACACCAGTGCTGATC  
AAATTAAGTGGAGATTGCATCGGCATGCAAGGATCGATGGTCGTGGCACCGCCTGTG  
TCTACGTCTCCTCCTTTAATTTCCAACTTTTCTCAACAATAGGCATATGCTAGCCCCA  
CTCACATTCTTAAAAGAATTGAGTCTCGAAAGAAAAAAGAGTACTAGTGTAGTATAG  
TGCTTATGGTGAAGGTGGCATGGACATTCCGCTAAACGTGGAGTTCCCTGCTCAAC  
TTTTCTTTTATTATGGCTTATGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAA  
TTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCNNGNNAACANCCNNNGGGGGGNNNNNNN  
NNNAAAAAANTATTTGNNNNNNCCCCCTTAATTNGGGNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
CNCNAAAAACNAANNNTTNANNNNGNAACTCCTTTTTNNNNNGGNANTCCN

**Bam 15R      AGATCGAATTGAGACGCATGCA**

**Bam 15F      AAAAGTCAGTGGTGGCATCGA**

**Bam17R**

GNNNNNNNNNNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT  
CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCCCGATCTCCCTTGGGTC  
TTGCCTAGATCCCCTCTTCTTCTTGACGTCCACCTTTATATAACTCGAATGGTGGTGG  
TAGTTTCTCTTTGAGAAAGGACGCCTTAATATCTCAAATGATAACCGTTGATGGGAGTT  
ATTAGAGACATGATGTCTCACTCATCGTGTGGTGGTTTCTACTAGGGTGAAGTTATGT  
GCACTTATTCTAGAGAATAAATACTCATGCTAACTGCCTTGTGAGACAGACCCACGTC  
TCAATGGGTTGTCGTAACAGGTCAGTCGGATTACGGCATAGTCATGGGGGGAATCTA  
TGACCACAAGGTGGTCATAGGATAGCTTACGACTATGCAATGGTCGTAGAAAAGCTTA  
CAACTACGAGGCAGTCGTAGAAGCGCTTACATCTACATGACGATCGTAGAAGAGCTT  
ACAACATATGGGATGATCGTAGAAGAGCTTACAACCATGGGACGGTCGTAGAAAAGTT  
TGACTATTTTGTAAAATCTCTCCCTTATGGATAAGGGGTATACTCGAGGAGCATACTG  
AAGTCACTATATCATTTACAGATAAATAATAATTTGAGGATTATTTATATCCTCATCATT  
TAGCCCCCAATTTCAAATGAAAGTAACTTACTTGAGAAAAAGGGGTCGCACATGAACA  
AAGATCGAAAAGTAGAGACTTTTCGATCTGATTCGACCAGAAACGAACTTGGTCAAAAA  
AGATAATTTCACTTGAGTTGTAAAGACATATCAACTTCAAACAGAGGAATGCAATCAG  
TTCCACCAATCTGTCCATTTGGAATGGTTCCTGAAGAGGTAATAACTGACCCGCATGG  
TTATAAACTTACCTGAAGGTAACCTTTTCTTACTTTCCCCTCTTGCTTCAATCGTCTCTG  
AGTTGCTGACAAAGCCTTCTTTCCTCCCTAATTTCTTCCAAATCCAAACCAATCGCTCA  
AAGAAAATGTCAANTCTTCTTCAATTGGCTGGTGNTAGAGAT

**Bam17F**

NNNNNNNNNNNNNNNNNGGGNGNNNNNNNTATTTAAGAAATCATCGATTGTCAAATTCT  
CAGTATATATACATGtGCTGGGACCCCTAATTTTCGTGGGTCTTAGGCAGTCGCCCTT  
GCCGCCCATACCCAGGACCGGTAGTCCGAATTCGGACTACCCACACACTCCCTCGG  
ACACAACAGGACCCACTTGGTGGGAATAACGAACTACCCATAGGAGTAAGTTTGGC  
TCCGAGGGCAAACCTTGTAATTCATACGCCTCCTCCTCCCACTTTATAAATAGGACCC  
CTTGTAAGTGATGAGGAGGAGGATATTTTATAACTCTAGACACTCATATGCAATACATT  
TGTCATTTCATTTCGTGTGTGATTCTCGTTGTGTCCCTTTGCATTATTGGCGGTCTTCGA  
ATCCCACCGAAGGTGCTTATAAGTATACTGTCCAATCTCGCATTTGATGACAAACAAA  
CAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATAGATAGATAGATGCATGTTCACTTGCCTCTTGTATCCCATGGAACAAGAAAGCCA  
CTATATATACATATATAAAGCTAGCCAAGTACGTCATGCCCCGAAGAAATTAACAATTC  
CACCCCCAAAGTGTTCAAGTACGATGGTGAGAAAGGGGTGAGCAGGAAGTTGAAGTC  
TGCACTCATAGTACGCTTGAAAAATTGAAATTTTCCCAATCTCCCGCGATAGCCAATG  
TTGTCCAGTAGTTTCAATCCACCTCACAAATTTCTCGAGGGAATTTTCTCTGCTACAA  
CCAAAGCTTTCATCTTTGCCTTATCCATCTCTAACACCAGCCAATTTCGAANAAGATTTT

GACATTTTCTTTGAGCGATTGGTTTGGATTTGGAAGAAATTAGGGAGGAAAGAAGGCT  
TTGTCAGCAACTCANANACGATTGAAGCAAGAGGGGAAAGTAAGAAAAGTTACCTTCA  
GGTAAGTTTTATNACCATGCGGGTCAGTTATTACCTCTTCAGGAACCATTCCAAATGG  
ACAGATTGGNGGAACTGATTTGCATTCCTCTGNTTGAA

**Bam 17F     GGTGCTTATAAGTATACTGTCCA**

**Bam 17R     TCTTCGGGCATGAGCTAGTTGGCTA**

**Bam18R**

NNNNNNNNTTNGGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCCTATATGACGCACAGTGC  
TCGGCATCTATATTTGCGAGTAGTTAACCGTTTTGTACAATTGACTACAGAGGAAAC  
ATGGCAGATCTGCGTACCTAAAATATGCGAACGATATTGGCAGGTCTGCGTACCTAAA  
ATATGCGAGTGATATTTACTACGAAATGTTTTGAGATCATTGCGATGCATTTGCGCTTT  
AATATCATCAGTTCCTTTTTCTAGCTCGGAAGAATTCAGATTACTGACGCAACCCG  
GTCAACAGCAAACCTTAATTCATCAGAACAAACATAAATCTATCACTTGTGCTCTAAA  
ACCCATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCAAGAAAGGTATTATTG  
ATTATTTCATACAACAACCTTGTCCATCCATCTACAAGAGATCTCACACACAGTATAGTA  
GAACCAATCTACAGTCAAAATTAATCGTACAATCCTTCTCCAGCATCCATTGAGTATAC  
TACAAGAACAAGAACCATATAAAGATTCTCTTTGGGAGCCCCAACAGATCACATTCTG  
TCCCCATCACCTGCAAAATTGGTCAAGCATTGTAGAGCACAGCAAGCAGGGGCATG  
CCTCTTCATCAGTTGCTACTTGCCGGTGCTAGCTCGAAGGTAGTAGTACTGGTAGTTG  
TAGATGTCTCTTTTGCGCCTAGGAGTCTAGATCCGAGAGAGAAGAGGAGAGGGAGAG  
GGGAGTACCGACCGTCGGATGCGTTGGAAGAGGAGCTGGTAGTCCGAATTCGCCCT  
ATAGTGAGTCGTATTACATTCACTGGCCGTCGTTTACACGNNNNNNNNNNNCCCNNN  
NNNNNNNNNNNNNAANAANAAAAANNGCACNCCNCCCTNNTGTNGGGGGGNNNNNT  
GNAGTANTGNGNNTNNNNNCTANNAACGCANNCCNCGCNCNCCNNNCCNNNGTTNTT  
CNNNNNNNTTTNGANNNGNNNNNGGGGNNNNNNANTNNNGNNNNNNNN

## Bam19R

NNNNNNNTNNNGNGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCACCTGGAGGAGCTCTAATT  
AGAATAGATATAGAGATATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGGTAGATAGA  
TCGATCGATAGATAGATAGATAGATAGATTGATTGATTGATTGATTGATTGATTGAAAT  
TAAAGCATATGCAATAATTTAAGTAACCATTTTTTTTGAATTTACACTTGAAATCTTACA  
CATTGCTAAAGTAAATTGAGAAGTACATCAATAATTCCATGCCAAACCAACACAATTC  
CACGATTACTTCCACTGTAATGTTGGTTTTCCACCAAATAATACATTGCATTTTTCTTTCC  
CAACCTTCTCTTCCAATTGGTGAAAGACGTCTCGATACTATGAAACACCATCCTATTAC  
AGTATTANNNGACGTANTTCAACTACNAANNGCTTCTATGCATCAACCCTNAATANNG  
NTGTNATNNATGTGGTTTTAGCAAANTANNTTANNTTNNTTATNNTATAAAAGTATAA  
NTNNAGCNCATATAAATGACATGAGCACTANNNNNGTATGTNATCACANNNNCTTTC  
TCANGTCATCTAGNNTNNNNATACTCATCATGTNNANACNAGATAATANNNAATTAGC  
ATATTGCTCANNTGNNATGNAATNNNNNTGCTCTTANATGTTGGATTGCTCTTNNNNN  
NNNNNAAGGTAGTCCNANTTCNNCNATAGNGAGTCGNATTACAATTCANNGNCCGNC  
GNTTTNNNNNNNCNN  
NNNGNNNNNNNCNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNNNNNNNNNNNNATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNATNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN  
NNNNANNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNN

## Bam20R

NNNNNNNNNNNTTNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCA  
CTCTAGAGGATCCCgggNccNNNcTCGAATTCGGACTACCCAGGACAATTCGATTTTA  
TGTAAGAGCAACTATTAACCTCATGGCACCTCACATGCTCGCAACTATAAAAAATGTC  
AATTGATGGTTCAAAATAAAAGTGGACAGACAAATGATATCTATCTATCTATCTATCTA  
TCTATCTATCTATCTATATCTTTACTAATTATCAATCAATCAATCAATATATCTTTACTAA  
TTAAAACTCTTTCAGATGCGCAACATTAATCCTAGGATGTAAAAAGTTAGAAATTATC  
ATATTATTCGGAGAAAAAATACTTGTAATTTTCACATTAGTCAGGAAAAAGAGAGAAT  
CTCAACCGTCTAATTTTTTAAAGTTGGTATAGGCTAAGGCTAAGATTAAATATTGTAGTA  
TTTGTACCCAAACAAGCTATTAGATTTTCGAGATAGATTAAGGTCTTGATCATTTTAACT  
TAAGCTTTTAGTTTTCTGACTTATTTTTTACTATTCATAAATTTTTCTTTTTTGTCTTGTT  
AGCTTTTTTGTAGCTTTTTTGC CGGTTCTTTTTTCGTGTATTCATTCTGATTATCCGTGA  
TGGGCTAACCTGTTTTTCTATGTTTAAATTGTTTAAATTTAGTTAGGTAGTCCGAATTC  
AATACATGAGCTTCGACCATTTGCAAAACACATTCGCAAATGCAAGCATCATGTCAAG  
ATGAGCTAGAGCAAGTGAGGTTTGAGCTATCAATACATGACGAGACTCAAACCTACTAG  
ACATGACCCCTCTTAATAGTACGGCAACCTATACTAGCAATCCGGTCTTCCAACCAAA  
CACCAAGACCGGTAAAAGACTAGGAACACATCCTTAGCCCTAGCTAGTCATACCTTTG  
CCTTGGGTCATCGTCTCGATATGCATCAACTCATGATGCATCCTTTTCATCAACACCAT

CAACTCATGATGGTCTTCGCTTGATCACNNTGATCAATCCTTGACATGCTTCAACACA  
TGAAGCATTCTCTNNN

## **Bam22R**

GNNNNNNNNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCCCAAGAAAAAAGATG  
GTTTGAGAATAAAGCAGCTTTGTTATGTGTAGCTAATGAGTATGCTGTGAGCTCTGCT  
TAGCTCCGTTGCCAATTAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
TAGATACCGAGTTGCTCTACTAATTATATGTTTTGCATAGATCGTTCAGAGAGTCACNG  
TTGGATGTGGATCTTGGAATGTTGCTCAGCATANTTAAAATAAAGATTGTTGTGATTCT  
GCCAAAAATTTCTGGAGTTTAAGCATGATAGTCGCATCTTCAGTCACCACTTGCAGT  
GCCTTTTAGTACCATTGTCTACAGCTTTAAGCAAACCTCCACATGATTTGCAGCCTGATC  
ATGAGCTGCTCGTGAGTTGNNNTNTTCAATNNCNACTTTTNNNTTCNACTTGACNNGN  
TNNNTANCACACNNNANGCNNNACACTNNANNNNNNNNNNAGTTGATCTGTCTCN  
NNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNANNNNNNNNNNNNAGCTNNNNNGNNNNNNNNNNNN  
TNNNATNTCANNNNNNNNNNNNTNNNNNGTGNNNNNNNNNNNNNAATTNNNNNCC  
NNNANACTAGTCTGNNNNNNNACNNTGNNTNNNNATNANNNNNAGGAGACTGNANG  
ANNTATGNATCANNNNNNNNNNGTNNGNCNGNNNNNNNGNNNNNANCNNNNNCNNNC  
NNNCTCCTNNNCANNNNNNNNNNNANTATNNTNNNNNNNNNNNTNNTNNNNNNNG  
NNNCNACACNNNNANNNANNNNNNANNNGNNANNNNCNNNANNNNNNNNGNTANTNNA  
NNNNNGNNNNNNNNNNNN

## **Bam22F**

NNNNNNNNNNNNNNNGGGCGATTTCGGACTACCACCAATCAACCACTTCAAACAATCA  
AATTAGTTTCTCCTTTAATTATCGATTATGCGGCGTGCCAAAATAATTGATTACCTACC  
ATGGCGCTGCATGCCAAAATTATCTATTGATTTTCATGAATACTACTGTATCTGTATGCA  
GGTACACATAGTACGAACAAGTACTACTTAGCATCACCATCACCTTATCATTTTAATCT  
CACAGTGAATTTGCTGCAGAACAAGTTCTGAACTAGGAATGCTTGTAATTAATGCAG  
AAAATTTACAATGAATTTTGCAGAAAATAGTTCAATCCCTCGGGAATTTGTTTGGGTAT  
CCTGTGTTCCAAACAGATCCTTATCCAGCGCGTAGTAATTTCTCCAAGAGGTAGTTGT  
AGTTTGTGTAATGGTTGCTCTCAAGTAACATCTTAAAAATGCATACCAGTCAAATGTTG  
CAAGCCTGCATGATTAAGTACTCAACTCACCACAATCATGTGTAACAGTTGCTAATCTT  
ACCACATGAAGAACATTCTTATATACACCATAGAGGCTTAAAAGTTAAACCATTGTATA  
GTTCTGAGGTAAATTGACAGCTTTTGTGTTAGTTTTTCATAGCTGTTGTTTTAGTATCAG  
ATGTGATAATTGATGCAAGAGGGGAGTAATCAATTAAGTACTGATACTGATACTTTATTGGA  
GGGAAGGGAGCATGTGAGATGGGATGATTGTGTTTTGCCATCCTCTTTGCAGACACA  
ACATCATGGTGGTTGATCCATAGCCTCATTCCAGTCTCCTCACTTTTGTACATAAAAAA  
ATTCCAGTGTCTTTTCCACTACAGACTAGTCTCTTTTGGTGTTTTTTAATTGTTTCTT



ATTTGGGTGCTTTACACACAACCTATGGGAGTAGAAAATTAATTGAGATATTAATAATTA  
CCCATTTTCATCAAAGCTCAAAGCTCAGGACCAATCCAGTGTTTCATGGAAAAGTTATC  
GGGCAGAGACAGATCGAACTGGTTAATTACTCCAGTGTGCATACTGTGTGCTAAT  
TTCAGCTGGTCAAGTTNN

**Bam 22R      GTGTAGCTAATGAGTATGCTG**

**Bam 22F      GTGACTCTCTGAACGATCTATG**

### **Bam39**

NNNNNNNTNNNGNGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCTAACTAAATTTAAAACAATT  
AAACATAGAAAAACAGGTTAGCCCATCACGGATAATACGAATGAATACACGAAAAAA  
GAACCGGCAAAAAAGCTCAAAAAAGCTAACAAGACAAAAAAGAAAAATTTATGAA  
TAGTAAAAAATAAGTCAGAACTAAAAGCTTAAGTTAAAATGATCAAGACCTTAATCTA  
TCTCGAAATCTAATAGCTTGTGGGTACAAATACTACAATATTTAATCTTAGCCTTAG  
CCTATACCAACTTAAAAAATTAGACGGTTGAGATTCTCTCTTTTTCTGACTAATGTGA  
AAATTACAAGTATTTTTCTCCGAATAATATGATAATTTCTAACTTTTTACATCCTAGG  
ATTAATGTTGCGCATCTGAAAGAGTTTTAATTAGTAAAGATATATTGATTGATTGATTG  
ATAATTAGTAAAGATATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATATCATT  
TGTCTGTCCACTTTTATTTGAACCATCAATTGACATTTTTATAGTTGCGAGCATGTG  
AGGTGCCATGAGTTAATAGTTGCTCTTACGTAAAATCGAATTGTCCTGGGGTAGTCC  
GAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGT  
GACTGGGAAANCCCNTGGCGN

### **4-2R**

NNNNNNNNNNNGGNGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCTTGCGATTATAATGGCTT  
GCATTTGATTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA  
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATATACTATTGCAAGCTCCTCAAGATGCCCCGATTA  
GTCCTAGGAGGAAAAACCTATAAATTATCATGTTAATTAATTGGAGAAAGACTCTTCT  
AGAACCACCATGTAAACCCTGAGTGGGAATAAAATAGAAATTACCATATATCTCACGT  
GAATAGCAAAATATCTTTAAAAAATAGCTAGAAGCTCCGATATCAATATAATCGAAGA  
TGACCATCCAAGTTTTTTAGATTCCTGCACCTGTGGCTTAGATTAATTAGTTGATACAT  
ACGGTTGTGTTGTAGCTATAACATTTTATATAACAGCAGGAAATATTCAACAAAAGAAA  
ATAGTAGATTGAAACAAATCGGATAGAACACCATAAATTTTATTTAAAAGTTCTGTC  
CACCATGAACATGAAATCGAGCATTAAACCTTTGAACTTTATAATTGCGTTCAAATA  
ACACCCTGATCCGGTTTCGCATTGTGATATTGTCTGCGTGACGTGATGAGTTGATGGT  
TTTACAACGTAAGTTGACACGCTAATCAAGTTAGATCAATGACATATGGGGTAGTCCG  
AATTCCTACTTTGAGAGGTTTTGTGATGAGACAGGTGTAGAGCTCCAGTTCTCTCTC

CGCACGTCCCACAGCAGAATGGCGTTGGAGAAGAAGAACCGTACCTTGGTCGAGAT  
GGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTAC  
AACGTCGTGACTGGGAAAANCCCNNGNGGN

**Bam 4-2R CCTTGCGATTATAATGGCTTG**

**Bam 4-2F CACTCAGGGTTAACATGGTG**

**6-2R**

NNNNNNNNNNNNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCAC  
TCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCAATAGTGTGCATGCTTT  
GGGCTAACCCGACAGGTACGACCCATTAGCTAGCACTATATGTCATCATTGGGAATC  
AAGGTAGGAAGACGATGAACCATATAGGAGAGGTGAGAATCCGTCAATTTCCGCATAA  
TCTAAACATTACGGATTACAAAGATCAGCGTGCAGCGGTGAAGCTTTTCCCATGGTGA  
GGAATTTGCTTAATTA AAAACCCCTTGCTCATCCTTGTAGGACACCCTTTTTCCTTCAAT  
AATTTGATAATTTAATTTTGTTCCTACTTTCCACCAAATTAGCAAACCAATAAGAATTGT  
GTATAATGTATAGTTATAAAAAATAAATCAATAAAAAATCTACATGCTATAATTTGGACCT  
AGCAAATAAGCGATGTAGA ACTTTTTCTTTTCTCTGATTACGTGGTTGAGAGCAA  
ATGTGATGGCTTATTTTGTATCGTTTTAAAAATATACTAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATACAAAATACATGATGTTCTAGTTTCACTAGCACAAATGGTAGTCCGAATTCGCCC  
TATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGGCNTGACTGGNANN  
NCCCCTGGGGNNNNNGNNNGNN

**9-2R**

NNNNNNNNNNNNNNNTNNNNNNGAANNATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGNN  
GACTCTAGAGGATCCCN<sub>g</sub>GgccNNN<sub>ctc</sub>GAATTCGGACTACCAGTTTTGAATGCATGNA  
ANAATGATCGACTCAGATGAATGATGCATAACAAATTAGTAGTGCAAAAACAAAAGGT  
GCAGACCCCGTCAACTCTTACTACTAGTGGGCATGTAATAACTGAGTTGTCTTTCATT  
GATTAGATACTACCAGGACACAAGAAGATTAGTAGTACAAGTGAGACCAAATTGTGTT  
CCAATAATGTCAACAAATTGTTTCAGATAGTTGCAGCTGGGTGTAAATCAGCTACTAGT  
TTATAGTAAGCTGCTAAAGTACTACTAGCTACTAGTTTAGGACCAACATGCATAATGCA  
AGACAAATATGGCAAAATATAGCTCACGTCAACTTTATCAAACGTTTCAGCTTATCTGC  
AACAAATTA AAAAGAAGCTTATTATGTCCAAATCCTTAATTA AAAACCTAGCATCAATTG  
CAACTCAGTATGTGCATACTATGAATCAGACCACACATATGTACCTCTCTATCTATCTA  
TCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTACGGTAACC  
ATCTCAA ACTATACATCACANAATCATAGTAGACCATAGTGAATGTACAATGCTGATCT  
AGAATAAGCAATAATCATGCTGACCAGGAATAAGCAATAATCACACCACCCCTGTAA  
AAATGANANAATAAAGCCCCNNTCACNAANANATGTATAAGCCTTGTGTTTGACATC  
ATTGNGTAAAAAAGGAACCTTGATTAGGTGATCAAATATCNAAAATTAATTAATGTGA

GTTGTTATGGCAACTGAACACNAACTAAACAATGNNNNCATTGGAATTCNCCCTAT  
AGTGAGTCGAATGACANTCACTGGCCGTCTTTTTACAACGTCNTGACTGGNAAAGGC  
CGNGNGNNNGNNTNNNGNTANN

**Bam 9-2R CCTAGCATCAATTGCAACTCAG**

**Bam 9-2F GATTATTGCTTATTCCTGGTCAG**

**11-2R**

NNNNNNNNNNNNNTTTNNNNNGNNNNNNNNNNNNACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGN  
NGACTCTAGAGGATCCcgggNccNNNctcgAATTCGGACTACCCCTCTCCTCAAACACCC  
CANGAGTAGCCTTTTTGGTATTTTGATGCCAAAGGGGCAGAAAATATGTGGAGAAGAC  
AAGGAAGGAGGAGAAAAGCAAAGAGAAGCCAAGTCATCAAGTCTGTCTATCTATCTAT  
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATGTGATGTAATGAATTTATGATGTAATGA  
ACTTATGCTATGTGATGTAATGAACCTTATACACTCTATCTTAATGCTTTACGAAATGCG  
AACATGCTTATGCTCAATGCTATGCCTATGTGCAACTTGAAAGTGTAATCATATTATAA  
AATGCATCTTGTGCTCAATTGTTATATTATTGCAATTTATCTTCTTCCTCAAGTTCAACA  
AATAAGGAAAACCTCTACCAAATTTTTCAAAAATTCTTACATGTGCTTGCAAATATTCT  
CACATTTAGATGCACATGTTTAGCGAAGCTTTCTTGTATTGACTTAAAAAGCAATCAA  
TTCTCTAAACTCATGTGAGATCATTGCAAGAATCACTTGTTTTCNAGTCAGAAAGAGA  
ATATACAACCTGTTTCCATACAAGTGGTATATTCAAAACCTTATTCCTCTCACATAATAT  
TTGTGTTGTCATCAATTACCAAAAAGGGGGGAGATTAAAGCATCTAGGTAGTCCGAA  
TTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGAC  
TGGAAGACCCTGGCGNNNNNNNGGNNNN

**Bam11-2R AAAAGCAAAGAGAAGCCAAGTC**

**Bam11-2F AGCATTGAGCATAAGCATGTTC**

**12-2**

NNNNNNNNNNNNNNNNNNATGAACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA  
CTCTAGAGGATCCCCGGGtAccGAGCTCGAATTCTTTAAAGAAAAAGAAGGAACCTTTGA  
GTTAATTGAAGAACTAAATGAATAAAAAAGTAGGAGAGGGATCACTAGTATCCCTCGT  
TGTCTAATTATTTAGACACAATTTGCCTCTTTCTTAGTCCTATTTTTGACTGGATTTATG  
TCGTGCCAATCCAACATAAGCCCTTATTTTATTTACTTTTTCTATCTAATTTGTTTTCTTA  
CCATTGTATTTCCATTGACAAAGGTCTATTGAACAAATAGAATTTGTAGATAGATAGGT  
CTCTTTATCCTCACTCCATATTAGGTTTTTCTGCCTACACTTCGCTCAAATGATAGGGT  
TGCCCTCTTGCATGTACTCTCATACAAGATTTTTTGATTTCTTTAATTTAAATAGAAAT

TGCTAAAAAATGACAATTTTGCCATCGTGATTGGAGCCGCTCTTTTTTAACCTTAGT  
 GAAATTTAACCGGACCTGTTCAATTTGGCATTGAGTGTTTTAATGGGGGATAAAATC  
 TTTCTTTTGATGTCTTGCTAGTTCAATGTTTTGACAGGAGCGTGCGGTGTAATCCATT  
 GATTTTTGGGTTTCGATCGTATCTAAGATCCTATTTTATCTGGGTGCTAACTCAATGG  
 TAGAGTACTCGGCTTTTAAGTGCGACTATGATCTTTTACACATTTGGATGAAGCAACAA  
 ATTCGTTTCAGACTCTTGGTAGAGTCTAGAAGACCACGACTGATCCTCAAGGGTAATGA  
 ATGGAAAAAATAGCATGNCGTAATAAAATCAAATTCCTATTTTTGATTTTTGGATGGATA  
 AAAAATTCCNATTTTCTGGGTCTAGTGAATAAATGGATAGAGTCTGGCTCCAATCTGG  
 TAAATAAAAAGCAACGAGCTTAACTTCTTAATTGAAATGATTCCCCGATCTAATTAGA  
 CGTAAAAAATAGATTAGTGCCTGATGCGGGGAAAGGTGGNTTTTCTATGAGNGNCC  
 TTGATTTTCTTGGTTTTTAGAATCCTA

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA  
CTCTAGAGGATCCCCGGGtaccGAGCTCGAATTCGGA CTACCTCTCAGAAAAGGAGGG  
AAAATATGGACAGTAAACACCAAACATCTCTCCTGTGAATTTCAATCTATCAAATTA  
TCCACAAATTTCAATTCCCAGCTTGATTTCCCTTCACACCTAGGCATAGCCTAATATATA  
GGACAGTACACGGACTTAATTACAAAGGATAGTAAACGGATCAATGGAACTAACAAA  
TTTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
ATTATATTATTAAAGCAAACATATTCCTTATAAAGGGCTAGAAATTCCTATATTAATTAA  
CGAAAAAAGTGTTAGACCATGTGATGGTCGTGATTAAAGTGATGATGAATAATTGATA  
TTTGATTGTTTTAGAATTTGTGTTTGTGCAAGTCTTGGTCGATCGCAGTTGAAATTTT  
TGGTTCCGAGTGGTTCCAATCTACTCTGAGTGGTTTTGTTGCTTTTCGAGTGATTTTCCT  
CGGCTCTGAGTGGTCTTGTTGCCTACAAGTGGTCTTGCTCAGCTACAAGTGGTTTTGC  
TCAGTTCCGAGTGGTTTTGATGCCTACAAGTGGTTTTGATTGGTTCCGAATGGTCTTG  
TTGCCACGATTGATTTTGCCTGTCTCTGAGTGGTTTTGCTCCACTCCGAGTGGTTTT  
CATTCCCTCCGAGTGGTTTTGCGTCTCTCCGAGTGCTGTTGTTGGCTTCAAGTAGTAT  
CAGGTA CT CACAAGAGTAGTGTAGCAGTGGGCGGTA CT CGCAAGGNTATTGTAGCAG  
TGGTCGGTACTCGTAAGAGTACTGTAGCAGTCCTCGGTA CT CTGAGGAGTGTTGTAG  
CANTGGTCGGTACTCGGAGCAAGACTACGANACGGCAGGCTTCGACCATANCACTA  
CGACCACGGCTATACGACCACAGCACGCTTCGACCACAGTGCTATGACATGNTGTAC  
AACACAGTGCTACNACCACNNNTNNNCAACCATGGNANNN

NNNNNNNNNNNNNNNNGNNNACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA  
 CTCTAGAGGATCCCCgggtaccGAGCTCGAATTCGGACTACCTGCTGACACATGTTCTGA  
 GATTTTAAGGTATTCGCTATTTTCACATTAATTAATCCTATGCAACAGTTGGTACTAATG  
 CCTCTTGAACATAACACATTCCATTTTTTGCAGTGCCACCAGCAGGAGCCGGGGCAACA  
 CATGTGGATTCTACGTTTGCCAACATATGGAAGTACTCCTCGATTCTCGACGCTCAC  
 CAATTCCAAGGTTTGTCACTCTTCCCATCATTACTTCATACTTATCACGTTACATATATA  
 CGCACATTGATATTCCTATCGACAGGTTGCGTCCATCCCGTCAACTGCATTGAAACAG  
 TCTCATTTTTCGAGGGATTCAAGGAGAGTTGGCGTACTTTTTGATTACTCAAGTCATAAA

GCCAGGAGGACGGTTCTACTGCGCACCATGATTTCTTATTAGTCTTATCACTAGGTGC  
 AAATGCAGTGTAGACATTTTCTAACTGTGCATTTGTTAATGGATATTTCAATTTCAATTCA  
 ATTAATCGATTTGCGAAATGGATGCATGCTTTATGTTTGTGAAATGAAGTGCGATGTCA  
 ATGGATGTTTTATGTCTGTGAAATGTATCTGAAAGGAAATGTGATGTGTGAATTGTAT  
 GTTTTTGTCTGTGATTATCTGCTTGTTTTAGAGGGCATGGCTAGCATTTCCTGAGGCT  
 AGCCAATAAACAGAAATAGATTCTGTTAGGGGGAAGAAATATCACAGACGGTTTTTAA  
 TGA AAAACCGTCTGTGATAACNNNNAATCACAGACGGGTCNACAACNGNCTGNGANA  
 ACTNGGATNAACACTGACCCATAATTTCAGAANGGTCAGAAACCNCTGTGNNGACG  
 TTTCTGAANCGTCTGTANTGGGGANTTANGNAAAGGTGTANACNN

## 16-2R

NNNNNNNNNNNNNNNNNTGAACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGAC  
 TCTAGAGGATCCCCGGGtaccGAGCTCGATTCCGACTACCACCCACATATCTCATGCA  
 ATCGAGTGCTACGTAGCGTCTCTGATGACCATATATATATAGTCATAATATAGATAGAT  
 AGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGGAATGCAC  
 CGAATAATTCAC TTGCAATGAATCTCTTAATTTAACTACAAGCTTTGTAGATAGATAGG  
 AATGCACCAAATAATTCAC TTGCAATTAATCTCTTAATTTAACTACAAGCTTTGTGCAAA  
 GAAAAAAGATCTAGGATGGGTGCGGTGAGGAGTCGTGGAACAATTAAGAGCTCTCAC  
 TCCAGGCTCCAGCTCCAGGGGCGGCGGACGGAGGGAGGGAGTAGTACACCTACTGT  
 GACGGACGGACGGTGGTTGCAATTAGCCAGCTAGTCACTCGCGATACAACAGAGCAA  
 TCTCTGTGATCGATCGATCGAGTCTTCCCACCCACCAAACAGTAGCTGAGCTTAG  
 GTAGTTGCTGCTGCTTTCTCCCGTTCCACCTCACCTGCCTCCCTACCTTCCAATCC  
 ATTTATATCATTGTTTGCTACGTGTTATCGTCAGTTCATATTGACTACGCCTGTTGAT  
 TTTTACACTTTTAGCTCAAAGTAAATAGTAGCGGTTAGAAAAGGTGATTCTTAGAAGG  
 AATAGATGAGCGACAGAGAAAGTGAAGGAGAAATACGTGCGTAAGATAGGAGCAAGA  
 GTAGTGGAATACGTAATGCGTCCGTGATCTCCGCCTTATTCCGGANCAAGACGAGAA  
 TAATGGGAGAGCTNNA AAAACCGTTTTGAAAANNCNACTGGGCGTACTGAATTCNCC  
 CTATAGNGAGTCGGATTACATGTCACTGGCCGTCGTTTACAACNTCGTGACTGGGAA  
 AACCTGGC NNGNNGTTCCGGGGGNAA

**Bam16-2R CATGCAATCGAGTGCTACGTAG**

**Bam16-2F GTGCATTCTATCTATCTACAAAG**

## 17-2R

NNNNNNNNNNNNNNNNNTGAACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACT  
 CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCACTTTAGTCAAGTATAC  
 AAGCTTGACCTATAGAGCTGTGATCGTGTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCT  
 ATCTATCTATCTATCTATCTATGATCCAATTAATTTAAAACCTTGAGTCTTGTGCGTAC  
 ATTGATGCATTTATGTTCTCCTTCATTTTGTGTGTGCGTTTAGCAACCTACCAAAAAAG



CTTCTTTTGTGGAAATAATGGTGTAGTGCACCTTTTCACCCATCGATCATGTGCTTGCA  
GGCATTCCCTGTACCATGTTTCTTGTATCTTATTTGTTTTCTTTTTGCGGCAAAAAAT  
AAATTTATTGTATCGTTGTTCTCGTTGGAACATTGGGAAACAATACAGAAATGAGAGAT  
ATTACAAGCAAGGTAGTCCGAATTCNCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGC  
CGTCGTTTTACAGCGTCNTGACTGGNAAAACNNNNCGAGGNNNGANGN

## 20-2R

GNNNNNNNNNNNNNNNTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGAC  
TCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCCCTTGTTTTTAGGGG  
GGAGAGGGAGAATTTATGACCATTAGATCTTTAATCTAACAGTTCTAAATCTAGATGAT  
AGTTAGGAAGAAAACATCCGGATGATGTTTAAACAAAACCTAAAGAGGAAAAAAGAAC  
AAAGAGTATATATTTATGAAAGAGATCGAATTGAGACGCATGCAGGAAGCTATGGGGT  
GTGTGTATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATGGATGG  
ATAGACAGATAGATAGCATCAGCAAGTCTCAAGGACATGCATACATATATTAGATAGA  
GAAAATTTGATCGATGCCACCACTGACTTTTTTTAGAGAACATACACCAGTGCTGATC  
AAATTAAGTGGAGATTGCATCGGCATGCAAGGATCGATGGTCGTGGCACC GCCTGTG  
TCTACGTCTCCTCCTTTAATTTCCAACCTTTTTCTCAACAATAGGCATATGCTAGCCCCA  
CTCACATTCTTAAAGAATTGAGTCTCGAAAGAAAAAAGAGTACTAGTGCAGTATA  
GTGCTTATGGTGAAGGTGGCATGGACATTCCGCTAAACGTGGAGTTCCCTGCTCAA  
CTTTCTTTTATTATGGCTTATGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACA  
ATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCNTGACTGGNAAACNCCCTGGCGAGNTT

## 24-2R

NNNNNNNNNNNNNGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACcGAGCTCGAATTCATATAAAAATCCAATAATAATTTCCAT  
TTAATTTTATTCATAACTTTAGTTGTTTTATTTGTATTTGATATTGACTATTTCTTTTAATA  
TAAGTTGTTATAATTGAGGTCTACTAGGTAAACAGTTAGATTTTTCTTCGATTAACATA  
AATAGTTCTAATCTTTAAGAGTACGCGTTACGGTGATTTCTTTTTCTCTATTTTCATAA  
TATAACATATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATACTCTCCGTAGTGCTAA  
ATCTTAGGACCGATCAGTGAAGCAAATTTTAGTACGTCAAAAGATACAGCAAGCAGCG  
GACCAAACAGCAGTAGTGACTAGTGAGCATCTCTCTCCTTGAGTGTGTGGACCCGGT  
GCATGAAGCTGAGGACTCACAGGAGACTGGATTGTCTCGTGGGATCGTCTGACAGCC  
GGAGCAGTGGGTAGTCCGAANTCNCCCTATAGTGAGTCNNATTACAATTCAGTGGCC  
GTCGTTTTACGACGTCGTGACNNGNAAAACCCCTGGCGAGNGN

## 25-2R

NNNNNNNNNNNNNTNNNNNATACTNNAGCTTGCATGCCTGCAGGTGCGACTCTAGAGGA  
TCCCgggNccNNNctCGAATTCAAATATATAATTTTATCTTAATTCNAAACACGCACAAAT

TCAATTTTTTGTATCTAAAATTGTGTTATCCAATTGTAGGTAAATTTGCCATCAAAACTAG  
ATGAACTAAAGTTTATATTTTTTCAGGTCTTCAACTTTACAATTTTTGAACAATAATTTTAA  
AAAATTATCCGAGTCTATATATGTACATATATACAAATCAAATATCAGATGCTCTCCTA  
GAAGTACTAGAAGTACTGATGTTAATCCTAACCGACTAAAGAAGAGAAACTTGCTCAA  
AATGATAAAGAAAAGAAACTTGCTCAAAATGATTCTTCTCTATCTATCTATCTATCTATC  
TATCTATTTATCTANCTGTCTGTCTATCTATCCAGTTCATGGTAGTCCNAATTCGCCCT  
ATAGTGAGTCGTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAA  
CCCTGGCGACNNNGGGGAN

## 26-2R

NNNNNNNNNNNNNNNGNTGAACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA  
CTCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCACCTATCTTATATGCATATATGAT  
GTCTGCAAAAATGCTGCTATCAGTATCCTCGGTTTGGGCTTACATATGATGCAGGCTT  
CAGAAAAACAACAGTCAAACCAGCTACCAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATA  
GATAGATAGGAGTGTCAATGTTTCGTTTCAGTGTACGTGCCGGAGTAGGTGACATTATT  
TTTCTAGGAGACGCATTCGTCGAGTACAAGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTC  
GTATTACAATTCAGTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGGCGA  
NNG

## 28-2R

NNNNNNNNNNNTNNNGANNNACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAC  
TCTAGAGGATCCCCGGGtAccGAGCTCGAATTCGGACTACCATCGTTGGACCTGGCAA  
GAGCTTTTTTTTTTTGTTTTTGGTTCGGTGATTTTCTCTGTATTCTCATTACGTGTAAGA  
AAACCCGTAAATCCTTGTTGATTCTGCTCCGAGCTTCCCATCGATCAAAGCTTTGGT  
CTCATCGCCCTCCTCACGCTATGCTTCCCCCCTTGCCTTGTACAACTATAAACAAC  
GCCTGTTATGGATTCCAAAACATCTCCTAGTTTAACTGAAAAATTTGTAATCATCGAT  
TCCACCATCAAATTCATTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATA  
CTAATTAATTGGAGGCTCCTCCACAAGCTCCCACGTGAGCTCTAGAAGGTTAAAAGG  
GNAGAAATTACTATATTAATCTAAAAAAGAAATAAAATCTAGAAATTTCCATATTAATCA  
AATAAAAACTAANAATCTAGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGNGAGTCNGATTACAAT  
TCACTGGCCNCCNTTTTACNAGGNCTAGACTGGGAAAACCCTGNNGANNGTNNNNA

## 29-2R

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAC  
TCTAGAGGATCCCCGGGtaccgAGcTCGAATTCAGGATACGCATAGACAAGTAAATAG  
CATTGCATTTAAAGCAAGAGATCCAAACATAGTTCATTACAAAGCATCGGAAATTAAAA  
TGAACATCCATAAGCATCACATGGTTCATTACACCATAAAATATTACAAAACCAATAG



ATAGATAGATAGATAGATAGATAAAGGACTTAAACTTCTTCTTCTTAAACTTCTTCTTCT  
CCTTGCTTCTTTTCTCCCCCTTTGGCATCAAAGTACCAAAAAAAAAAAGAACTAATCCT  
GAGCTGCACTAGGAGAAGGAGGAGCGCGACGACGACGAGTGCGGTAGTCCGAATTC  
GCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATTCCTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGG  
GAAAACCTGGGGA

### 31-2R

NNNNNNNNNNNNNNNNNGNNNNNNNTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGN  
NGACTCTAGAGGATCCCgggNccNNGcTCGAATTCAGTACGAACAGTTGATTTTTCAAA  
ACGGTTTTTCTAGCTCTCCCATTTCTCGTCTTGCTCCGGAATAAGGCGGAGATCAC  
GGACGCATTACGTATTCCACTACTCTTGCTCCTATCTTACGCACGTATTTCTCCTTCAC  
TTTCTCTGTGCTCATCTATTCCTTCTAAGAATCACCTTTTCTAACCGCTACTATTTACT  
TTGAGCTAAAAGTGTAaaaaATCAACAGGCGTAGTCAATATGAACTGACGATAACGAC  
GTAGCAAACAATGATATAAATGGATTGGAAGGTAGGGAGGCAGGGTGAGGTGGGAA  
CGGGAGAAAGCAGCAGCAACTACCTAAGCTCAGCTACTGGTTTGGTGGGTGGGAAG  
ACTCGATCGATCGATCGACAGAGATTGCTCTGTTGTATCGCGAGTGACTAGCTGGCT  
AATTGCAACCACCGTCCGTCCGTCCAGTAGGTGTACTACTCCCTCCCTCCGTCCGC  
CGCCCCTGGAGCTGGAGCCTGGAGTGAGAGCTCTTAATTGTTCCACGACTCCTCACC  
CGACCCATCCTAGATCTTTTTTCTTGCACAAAGCTTGTAGTTTAATTAAGAGATTAATT  
GCAAGTGAATTATTTGGTGCAATTCCTATCTATCTACAAAGCTTGTAGTTAAATTAAGAG  
ATTCATTGCAAGTGAATTATTCGGTGCAATTCCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATC  
TATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATANTATGACTATATATATATGGTCATCANA  
GACGCTACNTANCACTCGATTGCATGANATATGTGGGTGGAGTCCGAATTCNNCCNA  
TAGNGAGTCGTATTACAATTCCTGGNCGTCGTTTACACGTCGNGNCTGGNAAAACC  
CTGGNNGNNNNN

### 33-2R

NNNNNNNNCNCNTNTNGGTGAACTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGAC  
TCTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACCAAGTCGATTGATTGAG  
CTGAGTGAATCGGTTTTCTCGAGAGCCGGTTGATTGATTTTTTTTCGGGAGCCTTTTTT  
AACATGCTTCATGCTACGCGAAGGGAAGGATGATGGACAAACTCCCCATTTATATTAA  
TAGAGATGTTTTACTGTCCCAACTAAATGTGGACATGCTTGTGTGTGTCTATATAGATA  
GATAGATAGATAGATAGATAGATGTTTTGCTACATATGTCTCAGATAAAATTGATATTC  
ACGATATGATTTGGATCATATTTGCTAATATATATCACACTCTTAGTACTTCGTTGCAA  
TGTATAGACACCTTACTAGTAATTAATAAGGTAGAGCTGCAAAGGACGATGAAGAAGA  
ATAAGAGAGCTGGACAGGACCCATGAATACATAAGTTATGCTACGTGTTTAGGCACTA  
ATTATTGTAAATAACCAGAAATTTACGTGCGATAGATTCTATTAGTGTCTTGTCAATTG  
GTCAACAAGAACGAAGTGTCTCGTTATCGATCCCTGCTAGAAAGTCCCTCAACAAAAG  
TGGTTGGATAAAGAGGAAAAGATGCGGAGGTGTATATATATGTGTTTGTAAATAGAAA

GGAAAATTAAAGCACGTAAGCGGGTGCACATGTTAAGCAGTACAACACATCAAAATCT  
GCATCAATCCCCCTCTAGCGGTACACACCTTCCCCTCAGAAGGCAAAGATGCCGGCG  
GCTGCGACGGCGGCAGCGAGGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGNCGNATTAC  
AATTCACTGGCCGNCGTTTTACAACGTCGNGACTGGAAAANCCCNGGGGNNN

### 34-2R

NNNNNNNNNNNNNNNGNTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGA  
CTCTAGAGGATCCCCGggNccNANcTCGAATTCGGACTACCCGTGCATGCATGTGAGT  
TAAGAAGGAGCCTATGTAACCATCCCATCCAGAGTTCCAGGCTGCATCGATGGATCTT  
CTGATCCAGTATTAATGTCACACCGTCTACTAATTTGGATCACGTCACATATAATTCAT  
ATGAACTAGCCAACTGCTCGTGCAATTGAAAGGTGTAGTATGGTATCTATCTATCTAT  
CTATCTATCTATCTATCTATCTATTATATTATTAATGTCATGCCGTCTGCTAACCAGGAT  
CACATTATACTAGGTGACTAGCTGAAACAAATCACATATAATTCATACGGAATTGATAT  
CCTTCCTACGTCCGACCCGAAGGAATGATCGGACTCCTCACTCCACTCCAGCACTCA  
CACACACCTATTCTTTCCCAACTTCCACTCTCTTCCTCATGCATAGATGTGCTGCTCCT  
TCTCACCATCCCCGATGACCCTTTTTCCCTCCTCTGCTTTCCCAAGGCACTCCTAGGT  
GTTGCTATTCCCGGCGCCTCCCCATCCCTAACTCTCCTCCTGGTGACCCCTTCCCA  
CGCACCACCTTAGCATCGGATCTGGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTA  
CAATTCATGGCCGTCGTTTTACAACGGCNTGACTGNNGNNNCCCTGGNGANNNTGG  
NNNAA

### 35-2R

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNGAACNNTAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTC  
GACTCTAGAGGATCCcgggNNccNNNcTCGAATTCGGACTACCATATTATATAGTGTCNT  
TTGTGTGCTTTCACATAATAATCGAAGAAATGACCAGGGACTCCTATAGCTAGTCCAAT  
TTGGACTAGTAAGATGGTTGCTGGCTAGAATATCTAGGATTAGTTTGCTTCAAAGATC  
ACATGCCAAGCAAGCATGCCAGGGAAGGTGAGAGAGAGCTTGTGGAAGAATAAAGA  
AATGGGCATGCCGCATGCATGGTAAGACAGAGCTGCCTTGTATTCTAAGCATGGGAA  
GGAAGTGTGGTCAATGGAGTTAGGGTTAGGAAGGCAGTCCATTTCTACAAGACCCCA  
ATAATGTCATTAGTACACCTTACAAAAACAAAGGTTAGGAAAACAGTCTGTTTCCTGA  
AGAAAATGCTACCTACAGCACATGAGAAAAAATATTTGAAATTGTTGGCAAAGGACAA  
GGCACAGGTGGAGGAAAGATAAACCTGCTCCATAAAAAAACTTGAGGCATCAATCTC  
ACTTTCTTTCTTGTGATGAATTGAGGATCATCTGCTTTTTTCATAATTAGCTTTGTTGTTAA  
GAATTATCATCTGCTTGATTAAGTGTACTTTGTTACGATTTCTGAAAGATAATCAGCA  
TATACTCTCCCGCATATTCTCGAAAAGCATATATGCTGGCTATGCATTCTTGACAAGA  
TGGGGTTGGTTGGGCATGGTGCATCCATCAATTCCNACTCAGGCAACCAAGCTCATG  
GNAGCTATGCTTGTAAANTTAGCAAAAGGGTGCACCAAGCAGGCTTGCTCCTCATGCT  
AGCTAGAACCCGTGGTACTCACTTCTTGACGCCTTGCAAGTTGCTGCACACACACATCT

ATCTATCTATCTATCTATTCTACNTCAAAGTGGGTAAGCCGAATTCNNTTGAGCTACTT  
GTGATTTCTCTTAANCNTTGGGCTCTCTCCTGCTATTTNAGNACATATTCTTGGNCTTT  
AGGGNTCNAGANAANAGATGAAANTNATCAAAATCTNNNNNTTGATTGGGGGNCNNAN  
ATTTTTTANNN

## 36-2R

NNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNNTATNNNNNNCTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGNNG  
ACTCTAGAGGATCCCGggNccNNNcTCGAATTCAGTACGAACAGTTGATTTTTCAAaaCG  
GTTTTTCTAGCTCTCCCATATTCTCGTCTTGCTCCGGAATAAGGCGGAGATCACGGA  
CGCATTACGTATTCCACTACTCTTGCTCCTATCTTACGCACGTATTTCTCCTTCACTTT  
CTCTGTCGCTCATCTATTCCTTCTAAGAATCACCTTTTCTAACCGCTACTATTTACTTTG  
AGCTAAAAGTGTAaaaaATCAACAGGCGTAGTCAATATGAACTGACGATAACGACGTA  
GCAAACAATGATATAAATGGATTGGAAGGTAGGGAGGCAGGGTGAGGTGGGAACGG  
GAGAAAGCAGCAGCAACTACCTAAGCTCAGCTACTGGTTTGGTGGGTGGGAAGACTC  
GATCGATCGATCGACAGAGATTGCTCTGTTGTATCGCGAGTGAAGTACTAGCTGGCTAATT  
GCAACCACCGTCCGTCCGTACAGTAGGTGACTGCTCCCTCCCTCCGTCCGCCGC  
CCCTGGAGCTGGAGCCTGGAGTGAGAGCTCTTAATTGTTCCACGACTCCTCACCCGA  
CCCATCCTAGATCTTTTTTCTTTCACAAAGCTTGTAAGTTTAATTAAGAGATTAATTGCA  
AGTGAATTATTTGGTGCATTCTATCTATCTACAAAGCTTGTAAGTTAAATTAAGAGATT  
CATTGCAAGNGAATTATTCGGTGCATTCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATCTAT  
CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATATTATGACTATATATATATGGTCATCAGAGAC  
GCTACGTAGCACTCGATTGCATGAGATATGTGGGNGGNAGTCCGAATTCGGACTACC  
TTGCNNGATTTTATCGCCGCTTTGTCAAGGNANTTCGCCCTATANTGAGTCGTATTAC  
NATTCACTGGGCGNCGTTTTACACGTNNGGACTGGGAAAACCCTGGNGNTNN

## Conjunto dos de cebadores

### 2-1R GATA16

NNNNNNNNNTNNNNNGNNNTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTC  
TAGAGGATCCCCGGGTACcGAGCTC**GAATTCGGACTACTTATATAATAAATATCTCTA**  
**AAAGTTGTCTATAGAGAAAACACTAAAGCATTAAATTTGAGCATTCAATACTAACTTAA**  
**TCTTCGTGGCTATTGGCAAAGCATTAAATTTAATACTAACAGTCAATCACGCCAGCTCT**  
**AACATCGGTTTTTAGCCAATGATAACACCTATTTTTTCGTGCGATGCTGGCTATTGAAT**  
**AAGAGCCGGTTTTCTTCTCCATCTTCTTTCTCACTTTTCCACATAAAACAAAATTGATT**  
**TATACATACTAATAGTAAGTCCTTTTATATAGATAGATAGATAGATAGATAGAT**  
**AGATAGATAGATAGACTGCCTGCTTGTGATCAAGCAGTTGCAAGATCCATACATGTC**

AGAGTAGTTGAGTTGTTACAGGGCATGCATACACATTGCTGGAGTCTGCATAGGTAAT  
TAAACTCACGATTCTCCATATAAGAGTAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATT  
ACAATTCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACCCCTGGCGANNGN  
GNNNN

**Bam2-1R GTCAATCACGCCAGCTCTAACA**

**Bam2-1F CTCTGACATGTATGGATCTTGCA**

**2-2R CTAT10**

GNNNNNNNTTTNNGTGAACATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGGACTACTTCTCAAATTATAGCGCGT  
ATATCGAGAATTATACGCTCCGTCCTAGAGATTTTTAAATTACATCTAGATCGCTTTCT  
TGATGAAAAAAACCCGGATTTCTGATTACGCCAATCACGCATGGGCTAGTATATAACA  
CACCAACAAAGTTAGCTTTGTAGAGCATCGAGAGCCAGGTCAAAGAAGTTCACCTCG  
CCACAAAGTTATCTGTGCCTAGGCCAGCAGCTACTGTATCTATTTGCATATTGATAC  
GAACGCGGTCCAGCGGATCGTGGTATCGCATTCTCGCCAACGCGTGATTTCGAAAGC  
GCGACGCTCGCACATGCTCGCGGCCAGTAACGTTCTTGCTTTACGTGAACTTTCACT  
CGTTTGACTCCAAAAGATTACACAAGTTGTGAGCATAATATGAGCACGTATCAGGGTG  
TACTTTACCTTTTGAGTGGCAGGCACACTGGTGCCTACCCTCTGCGACTGAGTAGTC  
CGAATTCGGACTACTTTGCCACTTACTGAGAAGAATAGATACTTCTATCTATCTACTAA  
TTGGAGGCTCCTTCAGAAACCGCCACGTTAATCCCGAGTTAGGTAAAAAAGGTAATAAA  
TTCGTACATTAATCAGAGAAAAGAAAAAAAAGCTAGAAATAGCCATCTAAGAAAAAAG  
AAAAAGGCAGGGAGGAGACACATATCTATTAT**CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTA**  
**TCTATCTATCTATCT**AGTAATTGGAGTCCACGTATAGTTTGAATTAATCATATGTTGTT  
GACTCTTAAAGCCGATTATGATACGACAAAAAAGAAAGAACTTACCACACAATGCA  
TATATGTATAGGATTTGAAGGCTGACGACTCAAACTCAACAATAAAGAAATTTTGACGC  
GTTGGTTACATCCATANTAGCAATAGCCGTCTAANAATAAAGAANNNNAGGGGAAGAT  
GCATAGTAGTCGNNNGCCCTATAGTGAGTCGTANTNNANTTCANTGGNNTCNTTTACN  
ANGTCNGANNGNNNAAANNNNNNNNGNNGNNNGG





## 2-8R GATA9

NNNNNNNNNTNNGTGAACCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCTA  
GAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC**GAATTC**GGACTACCCAACAAAGATGGTCAGATTT  
TTCTGATTAACTGGGAGCTTCCTCAGAGTGTTTAATTAATATAAGTATAG**GATAGATAG**  
**ATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATAGATGTGTGTTGCTGAGCTCTATTTACCACG**  
CTGATGTCCATTCTCTTCACTAACAGGCTCATCTCCTGGTAGTCC**GAATTC**GCCCTAT  
AGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAACGTCGTGACTGGGAAAACC  
CTGGCGAGNN

**Bam2-8R CCAACAAAGATGGTCAGAT**

**Bam2-8F CAGGAGATGAGCCTGTTAGT**

## 2-9R CTAT7

NNNNNNNNNNNNNNNGTGANCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT  
CTAGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTC**GAATTC**TTACCCAATACCCTTGCCTGTCTAT  
CTATCTGTTAATTAAT**CTATCTATCTATCTATCTATCTATCTATA**CTAATTAGGCACTAT  
ACAAAAATTCTTTATTAATAAGGATAAAAAATAGAATAACCGCCTTAATCTTTGTGG  
GACTAAGTTATGTCTGCATTGCTAAAGCTGCCAGTTTTTATTGAACACATAACCTATCA  
TTGCCTA**GAATTC**GCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACA  
ACGTCGTGACTGGGAAAACCCTGNNNNNNGN

## 2-10R (=2-2 and 2-7) CTAT10

NNNNNNNNNNNTNNGTGAACCTATAGAATACTCAAGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACT  
CTAGAGGATCCCCGgGTaccgagctc**GAATTC**GGACTACTTCTCAAATTATAGCGCGTA  
TATCGAGAATTATACGCTCCGTCTAGAGATTTTTAAATTACATCTAGATCGCTTTCTT  
GATGAAAAAAACCCGGATTTTCGTATTACGCCAATCACGCATGGGCTAGTATATAACAC  
ACCAACAAAGTTAGCTTTGTAGAGCATCGAGAGCCAGGTCAAAGAAGTTCACCTCGC  
CACAAAGTTATCTGTGCCTAGGCCCAGCAGCTACTGTATCTATTTGCATATTGATACG  
AACGCGGTCCAGCGGATCGTGGTATCGCATTCTCGCCAACGCGTGATTCGAAAGCG  
CGACGCTCGCACATGCTCGCGGCCAGTAACGTTCTTGCTTTACGTGAACTTTCAGTC  
GTTTGACTCCAAAAGATTACACAAGTTGTGAGCATAATATGAGCACGTATCAGGGTGT  
ACTTTACCTTTTGTAGTGGCAGGCACACTGGTGCGTACCCTCTGCGACTGAGTAGTCC  
**GAATTC**GGACTACTTTGCCACTTACTGAGAAGAATAGATACTTCTATCTATCTACTAAT

**2-11R (=2-15) GATA13**

**Bam2-11R GGCGGTTATTCTATTTTATCC**

**Bam2-11F TACCCAATACCCTTGCTGTC**

**2-12R (=2-18) GATA8**

**bam2-12R CCTTCAATTAGTACATAGATAG**

**bam2-12F** GTACAGAACCATCTCATCCT

## 2-13R GATA8

156





TAGGATGAGATTGAATAGGATGAGATGGTTCTGTACCATTGGTTCCATTATTTTGGG  
TGAATGAAATGGTTCAGCATCTGTAGAGAATATTTCTCAAATTTGTATCACACCGTTTA  
GGATGGGATGATTTTCATTCAAGCAACCAAATATATAGATGGTATTTTTCTTGAAACATC  
TAGTCCGAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACAA  
CGTCGTGACTGGGAAAANNNNGNNNNNNGT

## 2-20R CTAT6

NNNNNNNTNNNNNNGNACTATAGAATACTCANGCTTGCATGCCTGCAGGTCGACTCT  
AGAGGATCCCCGGGTACCGAGCTCGAATTCGAGGGGTCTGCATATAAGCAGGTTCC  
CATAATGAAGAAAAGACACGCAGCACGTTGCCATAACCAATCCCCTCAAAATTAAAA  
CCAGAGGCAGCTAGCTTGCATGGTTGTGCGAGGTCAACTTTCCGATCGATCCCATGT  
TCCTGTCTCCCCATGGCGTACTGGCTGCATGTTCTCGTCCGGTCCGAGCAAGAGCTAGC  
CACTCTTCCGCACCAGCGACCTGTGCTAAATTGCTACCCAGCGCAGGTCACTCTTCC  
ATTAT**CTATCTATCTATCTATCTATCTATCT**CTAATCTATCTCGGATCTTGATAGTAGTCC  
GAATTCGCCCTATAGTGAGTCGTATTACAATCACTGGCCGTCGTTTTACANNNNCGT  
GACTGGNAAAACCCTGGCGANTGN

En la figura 3.1 se muestra la evaluación del primer conjunto de cebadores. En las figuras 3.2a y 3.2b se registra la evaluación de la segunda serie de cebadores de microsatélites.

Figura 3.1. Evaluación de la serie 1 de cebadores de microsatélites. El autorradiograma muestra cada par de cebadores usando 4 de los 13 individuos analizados (1.1, 1.2, 1.3 y 1.4).

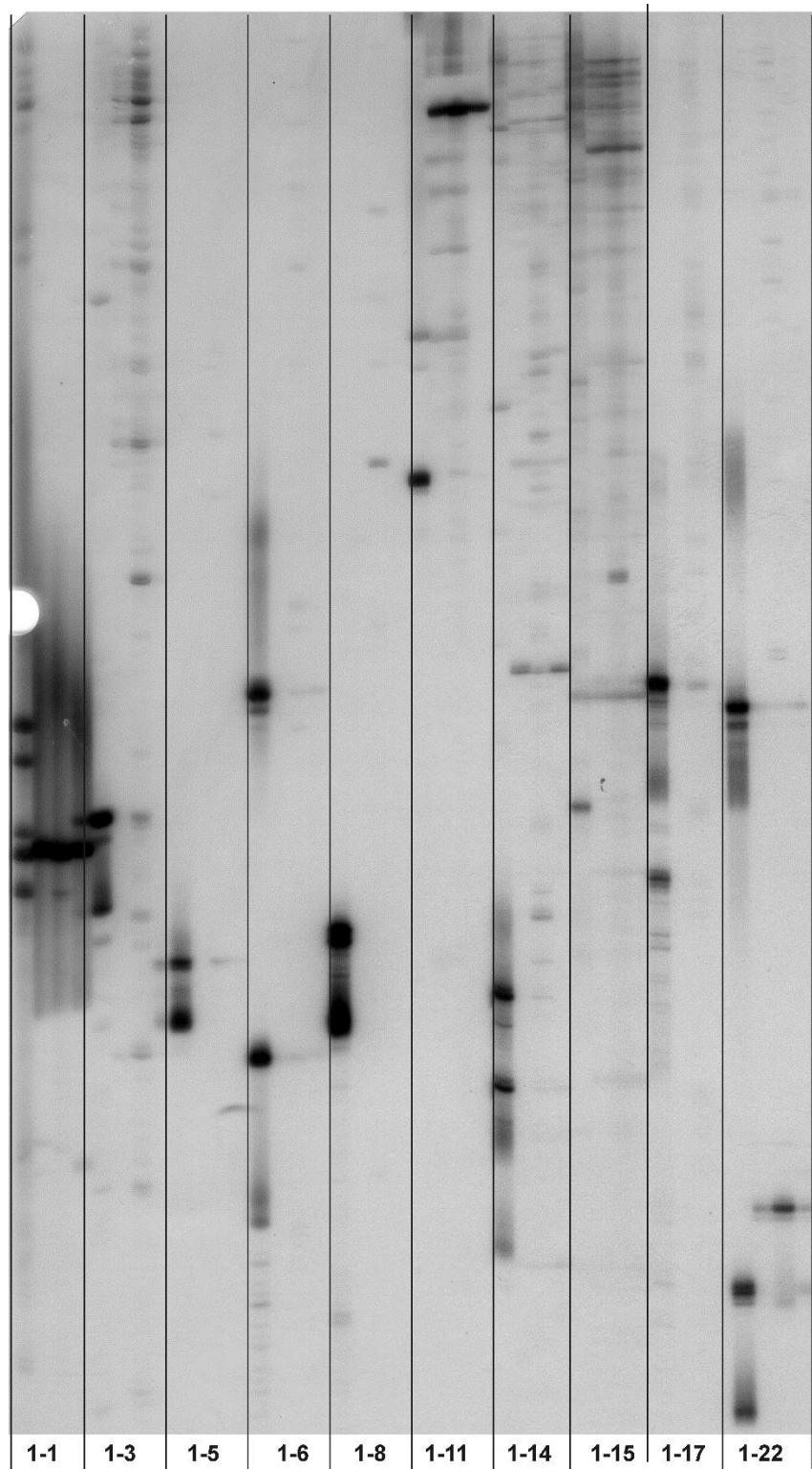


Figura 3.2a. Evaluación de la segunda serie de cebadores microsatélites. El autorradiograma muestra cada par de cebadores utilizando 8 de los 12 ADNs (2.1 a 2.8). Cada pareja de cebadores se indica en la parte inferior de cada panel y ADN genómico se indican 1-8 de izquierda a derecha a través del gel. El número aproximado de alelos para cada marcador están indicados en el fondo.

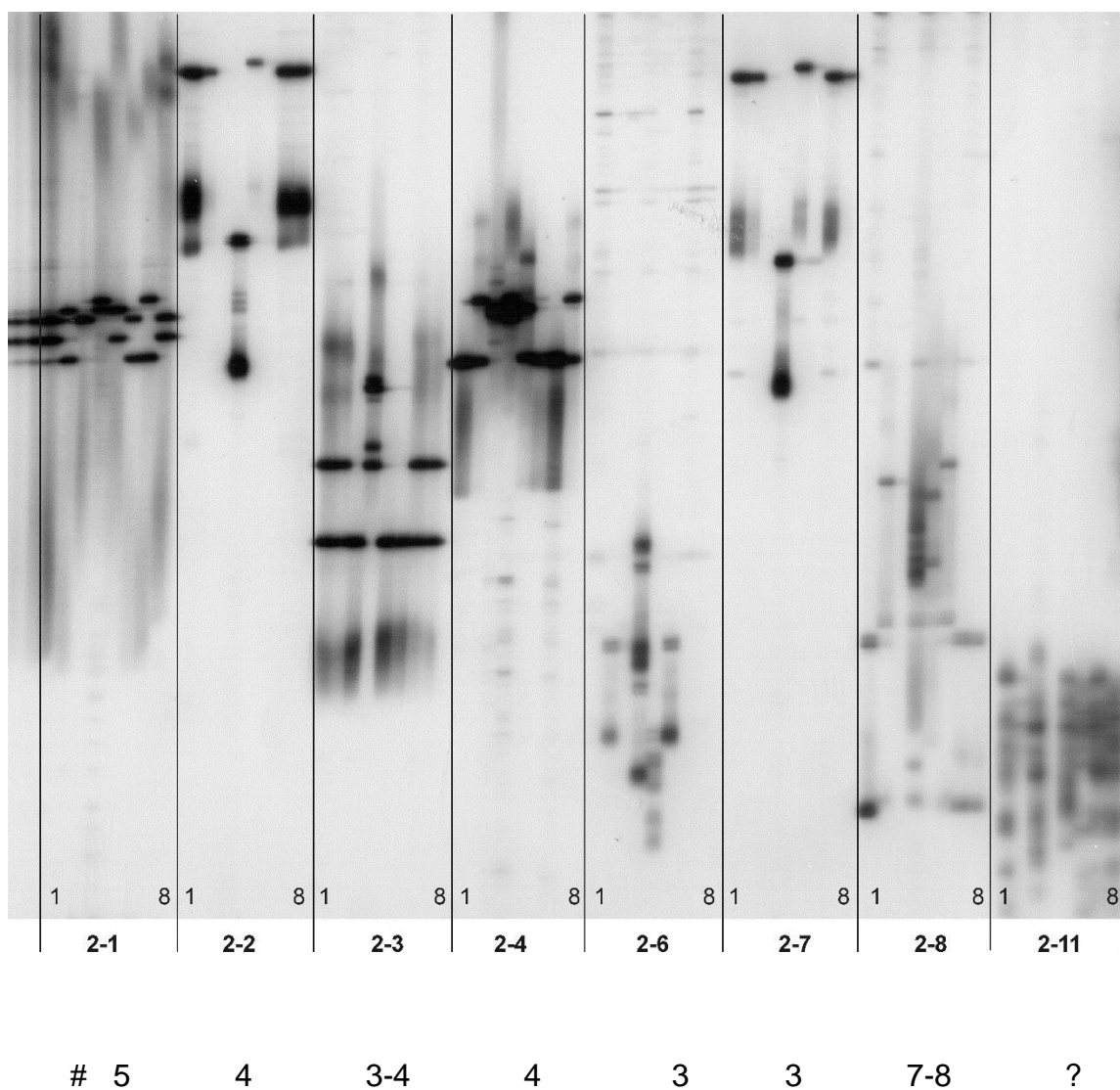
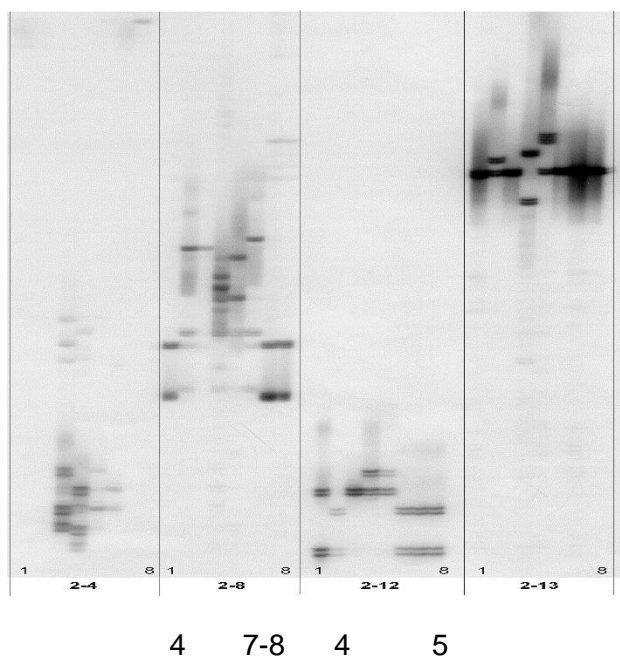


Figura 3.2b. Evaluación de la segunda serie de cebadores microsatélites. El autorradiograma muestra cada par de cebadores utilizando 8 de los 13 ADNs (2.1 a 2.8). Cada pareja de cebadores se indica en la parte inferior de cada panel y los DNAs genómicos son de izquierda a derecha a través del gel (1-8). Nótese que cebador 2-8 se repite en la figura 3.2a).



### 3.2.5. Estandarización de las condiciones de PCR para los marcadores microsatélites

Debido a que los microsatélites que se emplearon para la caracterización molecular de *G. angustifolia*, no fueron estandarizados, se procedió a hacer una evaluación de las condiciones apropiadas para la amplificación empleando 10 muestras representativas de la variabilidad de la especie.

Las condiciones iniciales bajo las cuales amplificaron los microsatélites en AT Genetics fueron: 1X Ultra Therm buffer, 0.2 uM de cada dNTP, 0,5 uM de cada primer, 1.5mM MgCl<sub>2</sub>, 0.05 U Ultratherm DNA polimerasa, 0.0125 U Vent DNA polimerasa para un total de reacción de 12.5 ul. La denaturación inicial del ADN se

llevó a cabo a 95°C por 3 minutos, la amplificación de los fragmentos se realizó en 35 ciclos como el siguiente: 95°C por 30 segundos, 55°C por 30 segundos, 72°C por 30 segundos. Al final de los 35 ciclos se llevó la temperatura a 72°C por 5 minutos.

A pesar de contar con estas condiciones de amplificación fue necesario ajustarlas al contexto bajo el que se trabaja en el laboratorio de biología molecular del Instituto de Investigación en Recursos Naturales Alexander Von Humboldt, en donde se realizó el trabajo de investigación, ya que tanto los componentes y concentraciones de los reactivos como los termocicladores (maquina automatizada que realiza la PCR) cambian de un laboratorio a otro, ocasionando modificaciones en la calidad de las amplificaciones. Debido a ello, se llevó a cabo la estandarización de 15 marcadores microsatélites con 10 muestras representativas de la variabilidad de *G. angustifolia* siguiendo los lineamientos de (Innis & Gelfand, 1990, Wu et al. 1991, Rychlik et al. 1990) y partiendo de las siguientes condiciones: buffer ( ) 1X, 2mM de MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de dNTPs, 0.072mM de primers (por efectos prácticos se combinaron el forward y el reverse), 3 U de TAQ y 20ng/ul de ADN para un volumen final de reacción de 25 ul. El programa del que se partió fue: 94°C por un minuto; 35 veces (94°C 30 segundos; 54°C 45 segundos; 72°C 45 segundos); 72°C 10 minutos, 4°C 5 minutos. Para evaluar el producto de PCR se utilizó agarosa al 1.0% y fluorescencia de luz ultravioleta, verificándose su calidad por la presencia de una banda única. Se realizaron geles al 1.5 % de 60ml. Se sirvió 8ul de producto+ 2ul de bluejuice; 4.2 ul de Mix. Los individuos empleados en la estandarización fueron los siguientes:

Código de Extracción	Código de Accesoión	Especie	Región de origen
1	375	<i>G.angustifolia</i>	Cauca
2	345	<i>G. angustifolia</i>	Santander
3	391	<i>G. angustifolia</i>	Nariño
8	1003	<i>G. amplexifolia</i>	Meta
17	282	<i>G. paniculata</i>	Córdoba
25	291	<i>G.angustifolia</i>	Meta
26		<i>Bambusa bambos</i>	
31	1029	<i>G.angustifolia</i>	Antioquia
38	1027	<i>G. angustifolia</i>	San Juan de Rio Seco
55		<i>Bambusa vulgaris</i>	

La PCR se realizó en un volumen total de 25 ul por muestra conteniendo 10X de buffer, 25mM de MgCl<sub>2</sub>, 5mM de dNTPs, 10mM de primers( forward y reverse combinados), 3 U de Taq polimerasa y 4ng/ul de ADN. La denaturación inicial se llevó a cabo a 94°C por 1 minuto, luego se dejó a esta misma

temperatura por 30 segundos, la hibridación de los primers se efectuó a 54°C por 45 segundos, la extensión se realizó a 72°C por 10 minutos. Este proceso se repitió 35 veces desde la segunda denaturación. La extensión final se efectuó a 72°C por 10 minutos y finalmente se dejó a 4°C por 5 minutos.

De los microsatélites analizados mediante este protocolo, solo dos amplificaron sin bandas inespecíficas: el Bam 2-11 y el Bam 2-13. Sin embargo el Bam 2-13 no tuvo muy buena señal y amplificó en las tres muestras de *G. angustifolia*, pero no, en aquella que se considera como *Guadua sp* (Figura 3.3 y 3.4). Por su parte, el Bam 2-11 tuvo una muy buena señal y amplificó en cuatro de las muestras evaluadas.

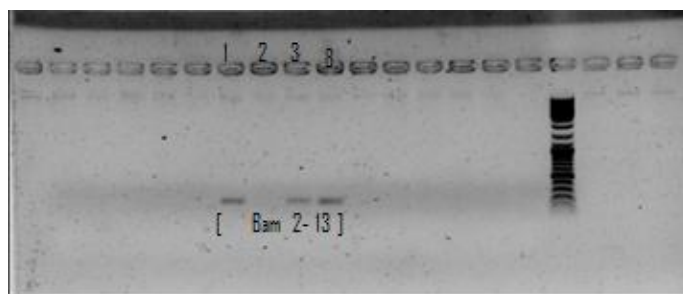


Figura 3.3. Evaluación del microsatélite Bam 2-13 en un gel de agarosa 1.0 %

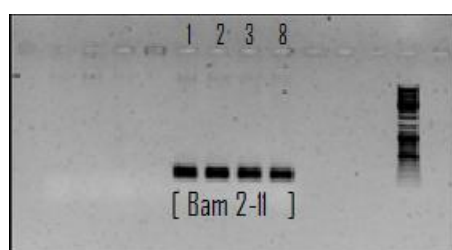


Figura 3.4. Evaluación del microsatélite Bam 2-11 en un gel de agarosa 1.0 %

Los microsatélites Bam 1- 15, Bam 9-2 y Bam 1- 1 (Figura 3.5) amplificaron claramente en una sola muestra, sin embargo, en esta se observan dos bandas con el Bam 1-15 y el Bam 9-2, indicando una posible contaminación del ADN. El Bam 9-2 amplificó con buena calidad para la muestra 31, siendo el único sistema de los estudiados que amplificó en dos muestras. En el Bam 1-15 amplificaron muchas bandas inespecíficas en la mayoría de las muestras, por lo que sería recomendable incrementar la temperatura de alineamiento en este sistema (Innis & Gelfand, 1990).



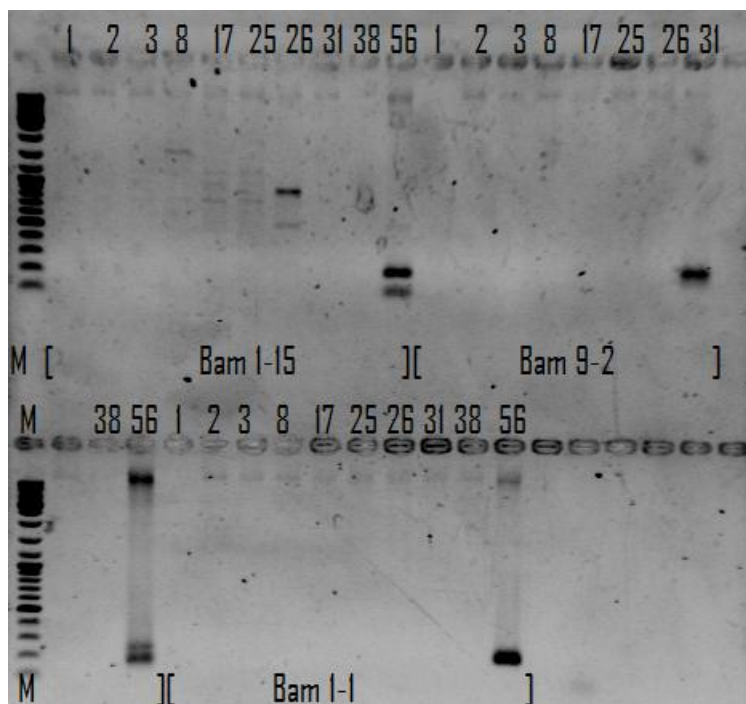


Figura 3.5. Evaluación de los microsatélites Bam 1-1, Bam 1-15 y Bam 9-2 en un gel de agarosa 1,0 %.

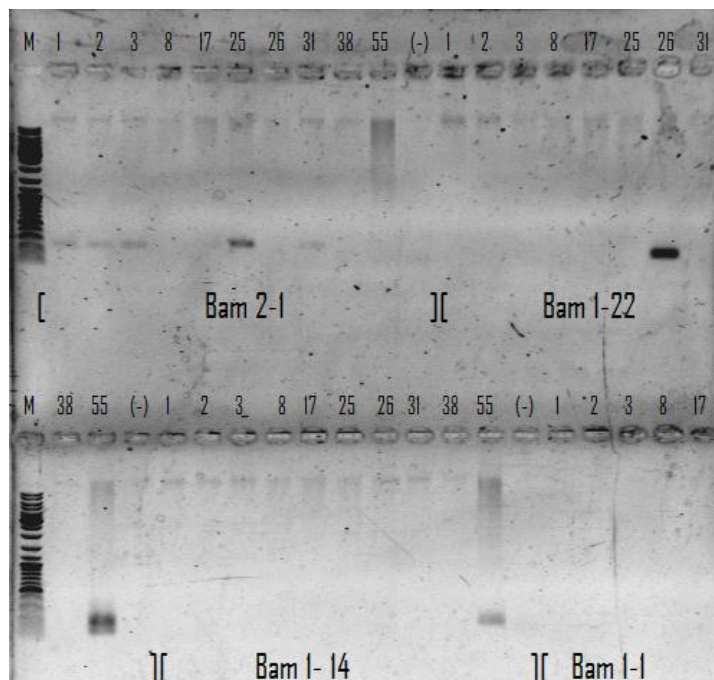


Figura 3.6. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 2-1, Bam 1-22, Bam 1-14 y Bam 1-11 en gel de agarosa al 1.5%.

El juego de primers **Bam 2-1** amplificó en todas las muestras de *G. angustifolia*, menos en la 38. A pesar de que la amplificación presenta baja señal, es posible que se obtenga un buen patrón de bandas en los geles de acrilamida. El fragmento amplificado por este sistema oscila entre 200 y 300 pares de bases (figura 3.6).

El juego **Bam 1-22** amplificó con buena señal en las especies de *Bambusa*, en ninguna otra muestra amplificó. Tal vez en acrilamida salgan bastantes bandas inespecíficas. Su tamaño oscila entre 100 y 200 pares de bases (figura 3.6).

El juego **Bam 1- 14** amplificó únicamente en *B. vulgaris*. El Bam 1-1 no amplificó en ningún individuo del genero *Guadua* y tampoco de *Bambusa* (Figura 3.6)

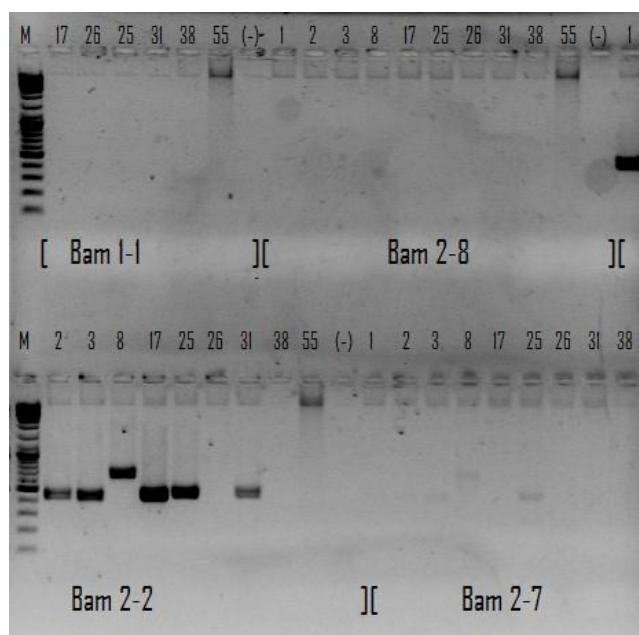


Figura 3.7. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 1-1, Bam 2-8, Bam 2-2 y Bam 2-7 en gel de agarosa al 1.5%.

Para el juego de primers **Bam 2-8** que debería amplificar para las muestras de *G.angustifolia* no se reportó ninguna banda, tal vez sea necesario reducir la temperatura de hibridación o modificar el protocolo para este sistema (figura 3.7).

Los primers **Bam 2-2** amplificaron exitosamente en todas las muestras del genero *Guadua* menos en la 38, reportando un tamaño del producto entre 400 y 500 pares de base en todas las muestras menos en la 8, correspondiente a *G. amplexifolia*. Este sistema parece ser muy informativo para el género (figura 3.7).

El **Bam 2-7** amplificó tenuemente las muestras 8, 25 y 3, sería conveniente verificar el producto en geles de acrilamida (Figura 3.7).

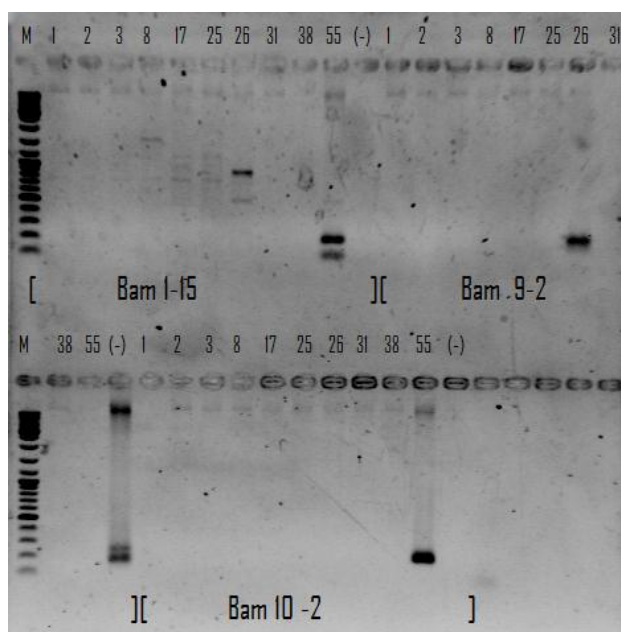


Figura 3.8. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 1-15, Bam 9-2 y Bam 10-2 en gel de agarosa al 1.5%.

El **Bam 1-15** amplifico en las dos especies de *Bambusa*, sin embargo, las bandas en la muestra 26 tal vez no sean del micro como tal sino bandas inespecíficas, ya que respecto a la banda amplificada en la muestra 55 hay una diferencia de aproximadamente 500 pares de bases, la cual es muy grande para un microsatélite. A su vez, la doble banda observada en la muestra 55 puede ser inespecífica. Se piensan confirmar estos resultados en geles de acrilamida. (Figura 3.8).

El **Bam 9-2** también amplificó únicamente en las dos muestras de *Bambusa*, presentando mayor señal en la muestra de *B. bambos*. El **Bam 10-2** solo amplificó en la muestra 55, es decir, en *B. vulgaris*. (Figura 3.8).

Los juegos de primers **Bam 17-2** y **Bam 1-8** amplificaron las muestras correspondientes a *Bambusa*. Sus tamaños oscilaron entre 200 – 300 pb y 100-200pb, respectivamente. **Bam 2-12** no amplificó en ninguna de las muestras, se debe modificar el protocolo de este sistema. **Bam 1-5** solo amplificó en la muestra 55, es decir, en *B. vulgaris* (Figuras 3.9 y 3.11). El **Bam 2-4** no amplificó en ninguna muestra, se deben replantear las condiciones de amplificación.

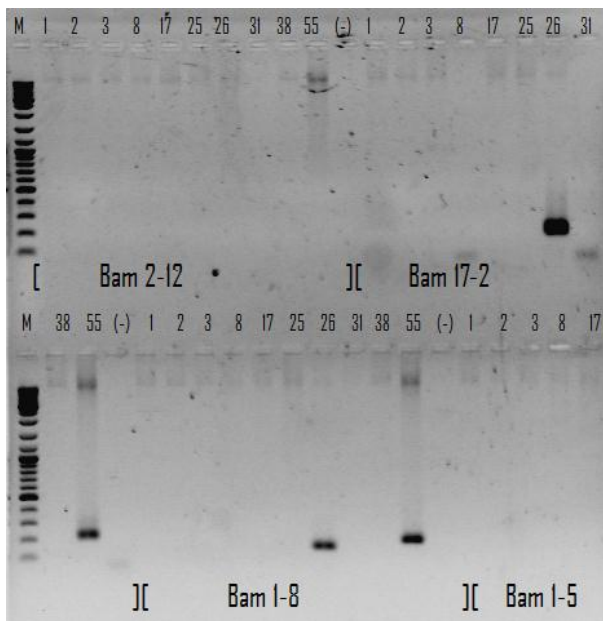


Figura 3.9. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 2-12, Bam 17-2, Bam 1-8, Bam 1-5 en gel de agarosa al 1.5%.

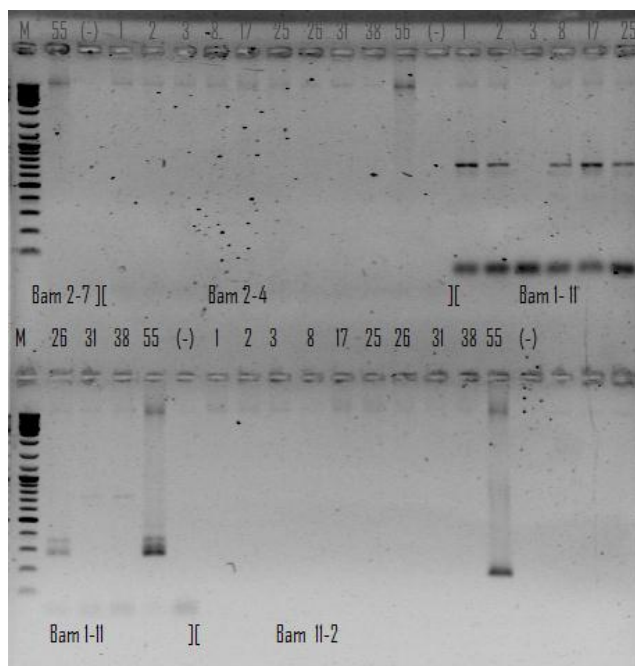


Figura 3.10. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 2-7, Bam 2-4, Bam 1-11, Bam 11-2 en gel de agarosa al 1.5%.

El **Bam 1- 11** amplificó en la mayoría de muestras menos en la 3, 31 y la 38 correspondientes a *G. angustifolia*, sin embargo este sistema parece ser bastante informativo para la familia, pues amplifica tanto en *Bambusa* como en *Guadua*. Las bandas que se distinguen debajo del marcador de peso son por la formación de dímeros de primer durante la reacción. A su vez, cabe anotar que la región que amplifica este sistema es de 600 a 700 pares de bases aproximadamente para *Guadua* y de 300 pb para *Bambusa*. El **Bam 11-2** solo amplificó en *B. vulgaris* (Figura 3.10).

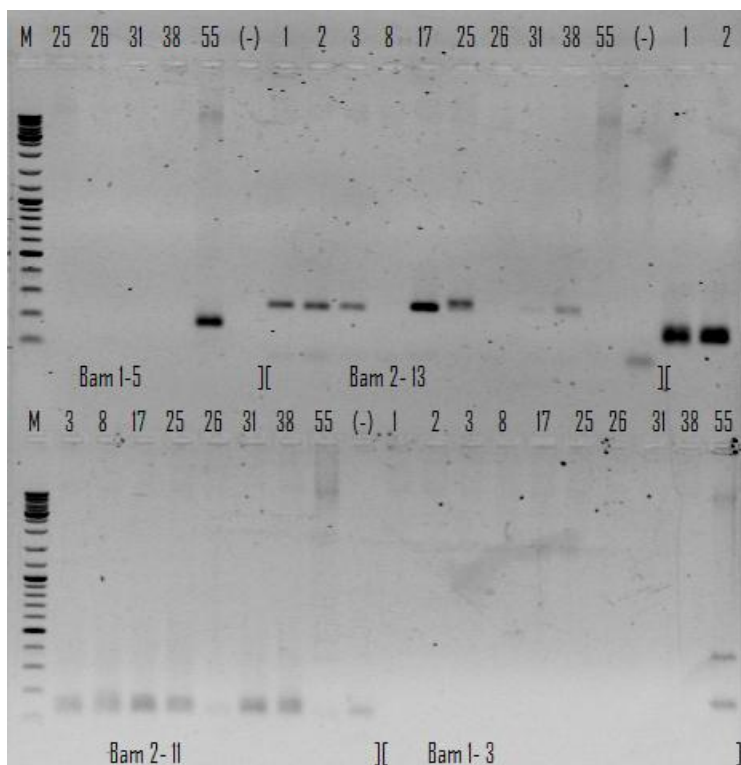


Figura 3.11. Visualización del producto de PCR de los microsatélites Bam 1-5, Bam 2-13, Bam 2-11, Bam 1-3 en gel de agarosa al 1.5%.

El **Bam 2-13** amplificó en todas las muestras de *G.angustifolia*, aunque en la 31 y la 38 la señal es muy baja. A su vez, se obtuvo producto para la muestra 17 correspondiente a *G. paniculata* pero no para *G. amplexifolia*. El producto está entre 200 y 300 pares de bases. (Figura 3.9). El **Bam 2- 11** amplificó en todas las muestras del género *Guadua* y El **Bam 1- 3** solo amplificó en *B. vulgaris*.

Estos resultados mostraron la existencia de dos grupos de cebadores microsatélites, uno que amplifica muy bien *G. angustifolia* y el otro grupo que amplifica *B. bamboos* y *B. vulgaris* (Bam 1- \*, y Bam 2- \*). En resumen, solo cinco cebadores microsatélites amplificaron para *G. angustifolia* (2-1, 2-2, 2-11, 2-13 y 1-11). Bam 2-2 es específico para el género *Guadua* y Bam 1-11 es un cebador que amplifica los géneros *Guadua* y *Bambusa*. Bam 2-4 y 2-12 no amplificaron en ninguna muestra (Tabla 3.2).

Tabla 3.2. Lista de microsatélites amplificados con esta estandarización.

Microsatélites	<i>G. angustifolia</i>	<i>G. amplexifolia</i>	<i>G. paniculata</i>	<i>B. bambos</i>	<i>B. vulgaris</i>
Bam 2-1(O)	X				
Bam 1-22 (P)				X	X
Bam 1-14 (Q)					X
Bam 1-15 (M)				X	X
Bam 9-2 (N)				X	X
Bam 10-2 (R)					X
Bam 2-2 (U)	X	X	X		
Bam 17- 2 (H)				X	X
Bam 1-8 (I)				X	X
Bam 1-5 (K)					X
Bam 2-13	X		X		
Bam 2-11	X	X	X		
Bam 1-3					X
Bam 1-11	X	X	X	X	X
Bam 11- 2					X

Se considera necesario ajustar el protocolo de PCR incrementando la temperatura de alineamiento y la concentración de  $MgCl_2$  en aquellos sistemas que amplificaron, de tal forma que se pueda aumentar la señal y calidad del producto de PCR. En los sistemas en que no se observó resultado alguno es conveniente replantear gran parte del protocolo partiendo por variar la temperatura de alineamiento principalmente (Rychlik et al. 1990). Se sugiere por la naturaleza de cada sistema microsatélite optimizar independientemente las condiciones de PCR. Es necesario estandarizar el protocolo de PCR independientemente, para los cebadores Bam 1-\* y Bam 2-\*, ya que presentan comportamientos diferentes en la amplificación y en los individuos analizados (Tabla 3.3.). Adicionalmente, se sugiere continuar con este

estudio, ya que hubo muestras que no amplificaron para ningún sistema microsatélite (Bam 2-4 y 2-12).

### **3.2.6. Condiciones finales de amplificación de las regiones microsatélites**

Inicialmente, se probaron 26 microsatélites diseñados para *G. angustifolia* mediante PCR en las accesiones de esta especie, posteriormente, se evaluaron en las otras especies de *Guadua* y *Bambusa*. Cada mezcla de reacción contenía 35ng/ul de ADN, 10mM Tris pH 9, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM de cada dNTP, 0.072μM de cada cebador y 3U Taq polimerasa (Unidad de Biotecnología CIAT), para un volumen final de reacción de 25 μl. Se usó un termociclador PTC- 100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, siguiendo el programa: 94°C por 1 minuto (94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos) 35 veces, 72 por 10 minutos, 4°C por cinco minutos; con la temperatura de anillamiento específica de *G. angustifolia* optimizada para cada locus, la cual, funcionó para las otras especies del género *Guadua* y *Bambusa* (Tabla 3.2). El producto de la reacción se evaluó en geles de agarosa al 1.5%, teñidos con bromuro de etidio, cargando 8 μl del producto junto con 2 μl de buffer blue juice. La identificación de cada alelo por locus se efectuó por medio de electroforesis vertical en geles de poliacrilamida al 4% preparado en TBE 0.5X. A los productos de PCR se les adicionó una solución de formamida (0.05% azul de bromofenol y xilencianol, en 95% de formamida, 20 mM EDTA) en una relación 1 μl de la solución por 5 μl de producto de PCR y se desnaturalizaron a 94°C por 5 minutos antes de servirlos. La cantidad de producto adicionado en el gel varió con su concentración. La separación electroforética se realizó a 120W, con una corriente inicial de 1.800 a 2.000V con una temperatura óptima de separación de 50°C. Después de aproximadamente una hora de separación, el gel se fijó, se tiño con nitrato de plata y se reveló de acuerdo a la metodología de Bassam et al. 1991. La lectura de cada gel se realizó sobre un transiluminador de luz blanca, contando las bandas con mayor resolución.



### 3.2.7 Evaluación de los microsatélites

A partir de los perfiles obtenidos en los geles de poliacrilamida, se establecieron visualmente los alelos de cada locus con base en su tamaño molecular (pb) usando como referencia los valores conocidos de los marcadores 10bp y 25 bp (Invitrogen Corp., Carlsbad, California). Posteriormente, para describir los genotipos se generó una matriz de presencia /ausencia (binaria) de alelos para cada microsatélite. Se contabilizó el número de alelos identificados por locus (A) y se estimaron sus frecuencias respectivas utilizando la plataforma SunOS 5.9 de SAS versión 9.1.3. (2011). Con estas se calcularon los siguientes índices de diversidad para cada sistema microsatélite: la riqueza alélica (A-1), la homocigosidad observada ( $h_o$ ) o número de homocigotos en cada locus, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) o número de heterocigotos en cada locus, la heterocigosidad esperada insesgada de Nei (1978) para cada locus  $He = 1 - \sum p_i^2$ , y el contenido informativo polimórfico (PIC) según Botstein et al.(1980),

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde,  $p_i$ = frecuencia del alelo i y  $p_j$ = frecuencia del alelo j; También se estimaron:

1. La probabilidad de identidad (I) definido por [Paetkau et al. \(1995\)](#), como la capacidad de que dos individuos al azar de la población dentro de un determinado locus tengan el mismo genotipo,

$$I = \sum p_i^4 + \sum_{j=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

Tabla 3.3. Microsatélites estandarizados en las diferentes especies de los géneros *Guadua* y *Bambusa* con la temperatura de anillamiento de *G. angustifolia*.

<b>Locus</b>	<b>T. anillamiento en <i>G.</i> <i>angustifolia</i>(°C)</b>	<b>Tamaño esperado (Pb) en <i>G. angustifolia</i></b>
Bam 1- 14	54	230
Bam 1- 15	54	180
Bam 11- 2	54	120
Bam 1-11	54	280
Bam 1-17	54	250
Bam 1-22	54	280
Bam 1-3	54	150
Bam 1-5	54	180
Bam 1-6	54	250
Bam 16-2	54	200
Bam 17- 2	54	250
Bam 1-8	54	250
Bam 2-1	50	250
Bam 2-11	54	150
Bam 2-13	54	250
Bam 2-2	54	500
Bam 2-3	48	180
Bam 2-5	48	250
Bam 2-6	50	180
Bam 2-7	54	500
Bam 2-8	45	200
Bam 4-2	54	250
Bam 9-2	54	180

2. La probabilidad de identidad combinada ( $I_c$ ), basada en el concepto anterior pero combinando todos los loci, indica que tan buen descriptor de la diversidad son los microsatélites en conjunto,

$$I_c = \prod I_k$$

Donde K es cada locus.

3. El poder de discriminación ( $pD$ ) por locus (Jones 1972) que es la probabilidad de encontrar al azar dos individuos con genotipos diferentes dentro de una población con un determinado locus,

$$pD = 1 - I$$

La evaluación del contenido informativo de los microsatélites se llevó a cabo solamente en *G. angustifolia*, debido a los objetivos propuestos es este trabajo (Tabla 3).

#### 3.2.8. **Amplificación de los sistemas microsatélites**

Se evaluaron 8 de los 9 microsatélites reportados por Pérez – Galindo et al. 2009 (Tabla 3.4). Cada mezcla de reacción contenía 35 ng/ul de ADN, 10 mM Tris pH 9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de cada dNTP, 0.072 µM de cada cebador y 3U Taq polimerasa (Unidad de Biotecnología CIAT), para un volumen final de reacción de 25 µl. Se usó un termociclador PTC- 100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, siguiendo el programa: 94 °C por 1 minuto (94 °C por 30 segundos, 54 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos) 35 veces, 72 por 10 minutos, 4 °C por cinco minutos.

#### 3.2.9. **Análisis estadístico de los Datos**

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los programas GENES ver 7.0 (Cruz 2008), TFPGA (Millar, Mark P 1997), GENALEX 6. (Peakall & Smouse 2006) y POPGEN 32 ver 1.31 (Yeh Francis C. 1997).

### 3.2.10. Diversidad Genética

Para evaluar la diversidad genética de las poblaciones se estimó:

- a. **El número promedio alelos observados por locus ( $\bar{n}$ )** como la suma de todos los alelos detectados en todos los loci ( $n_i$ ), dividido por el número total de loci estudiados ( $L$ ).

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^L n_i}{L}$$

- b. **El Número efectivo de alelos ( $A_e$ ):** Este estimador Indica el número de alelos que se esperaría en un locus, en cada población, si se asumiera que la población estudiada se comporta como una población ideal. Se calcula invirtiendo la medida de la homocigosidad esperada en un locus.

$$A_e = \frac{1}{1-h} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

Tabla 3.4. Código de acceso en el Genbank de los ocho loci microsatélites evaluados y reportados por Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (Pérez-Galindo et al.2009).

Locus No.	Motivo de repeticion	Tamaño (bp)	Temperatura de alineamiento
FJ444930	(GATA) <sub>8</sub>	250	55
FJ444929	(GATA) <sub>10</sub>	250	48
FJ444932	(CTAT) <sub>10</sub>	500	54
FJ476075	(CTAT) <sub>13</sub>	180	48
FJ444934	(GATA) <sub>16</sub>	180	50
FJ444931	(GATA) <sub>16</sub>	250	50
FJ444936	(GATA) <sub>9</sub>	200	55

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ . Esta medida está afectada por la proporción de loci polimórficos, el número de alelos por locus polimórfico, y las frecuencias alélicas.

- c. **Número total de loci (L):** Sumatoria de los loci estudiados en una población.
- d. **Porcentaje de loci polimórficos (P):** En este estudio se considera a un locus polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 95% en la población bajo estudio.

$$P = [(Número\ de\ Loci\ polimórficos) / L] \times 100$$

- e. **Heterocigosidad observada por locus ( $H_0$ ):**

$$H_0 = \frac{\text{Número de individuos heterocigotos}}{\text{Número total de individuos analizados}}$$

- f. **Heterocigosidad esperada por locus ( $H_j$ ):** El nivel de polimorfismo de cada locus se calculó mediante la heterocigosidad insesgada de Nei (1978) y el índice de contenido informático polimórfico (PIC) de Botstein et al. (1980), mediante los programas GenAlex (Peakall & Smouse 2006) y The Excel Microsatellite Tool Kit (Park 2001).

$$H_j = \frac{2n(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2)}{(2n - 1)}$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en el locus estudiado y  $n$  es el número de individuos muestreados por locus.

- g. **Contenido de información de un polimorfismo, “Polymorphism Information Content”, PIC** (Botstein et al. 1980).

$$PIC = (1 - \sum_{i=1}^n p_i^2) - 2 \sum_{i \neq j}^n p_i^2 p_j^2$$

Es una medida de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Se define Informatividad de un marcador molecular como la probabilidad de que un descendiente de una pareja sea informativo, es decir, que se pueda deducir el origen parental de cada uno de los alelos de ese locus.

PIC junto con ENA sirven para evaluar la utilidad de un determinado locus de un marcador molecular para distinguir entre las UBC analizadas.

- h. **Heterocigosidad esperada (heterocigosidad media o diversidad genética media,  $H_e$  (Nei 1978)).** Expresa la heterocigosidad esperada en el locus medio si el apareamiento fuese al azar.

$$He = \frac{\sum_{j=1}^n H_j}{n} = \frac{\sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (1 - p_{ij}^2)}{n}$$

Donde:

**$H_j$** : Heterocigosidad esperada en un locus  $j$

**$p_{ij}$** : frecuencia del alelo  $i$  del locus  $j$

**$m$** : número de alelos en el locus  $j$

**$n$** : número de loci considerados

i. **Heterocigosidad esperada en cada subpoblación ( $H_s$ ):**

$$\widehat{H}_s = \frac{\sum_{j=1}^S H_j}{S}$$

Donde  **$H_j$**  es la heterocigosidad esperada de locus  **$J$**  en la subpoblación  **$S$** .

j. **Heterocigosidad esperada en la población total ( $H_T$ ):** Se estima asumiendo que todas las subpoblaciones hacen parte de la misma unidad panmíctica y esta se comporta como una población ideal.

$$H_T = H_s + D_{ST}$$

Para evaluar el grado de diversidad genética en *G. angustifolia* se realizó una prueba de permutación empleando el algoritmo EM (Slatkin & Excoffier 1996) empleando el programa Arlequin 3.11 (Schneider et al. 2000) con un nivel de significancia de 0,05. Para probar estadísticamente el equilibrio Hardy- Weinberg

en las poblaciones por locus se realizó una prueba de Ji - cuadrado mediante el programa GenAlex (Peakall & Smouse 2006).

#### **3.2.11. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

La distribución de la variación genética en los municipios del Valle del Cauca se realizó mediante un AMOVA (Analysis of Molecular Variance) usando el programa Arlequin 3.11 (Schneider et al. 2000). Los índices de fijación se estimaron por localidad, mediante los modelos de evolución de SSR de alelos infinitos y de mutación por pasos ( $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , respectivamente). El valor de significancia de los estimadores fue de 0.05 y se obtuvo usando 10000 permutaciones.

#### **3.2.12. Relaciones genéticas entre los individuos**

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la diversidad genética en el Valle del Cauca, sin asumir agrupamientos a priori como el establecido por los municipios, se desarrolló un análisis de las relaciones genéticas existentes entre cada uno de los individuos. Se calculó la similitud genética entre parejas de genotipos mediante el coeficiente de Nei-Li (1979). Posteriormente, con la matriz de similitud genética, se llevó un análisis de agrupamiento a través del método UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Average) con el programa NTSYS-pc versión 2.02i (Rohlf, F.J. 1996), porque produce menor distorsión al compararse con la matriz de similaridad original (Olmos y Direnzo, 2004). Los grupos formados se confirmaron estadísticamente empleando el método bootstrap (re-muestreando 10000 veces) con el programa WinBoot.



### 3.3. Resultados y discusión

#### 3.3.1. Extracción y cuantificación del ADN

Mediante el protocolo de microextracción de ADN Dellaporta (1983), con modificaciones para arroz y posteriormente para *G. angustifolia* (Potosí et al. 2006), se obtuvo el ADN con mejor calidad y mayor concentración (93,16ng/ul). Con el kit de extracción de Quiagen se alcanzó una concentración de 30ng/ul de ADN, mientras que con el protocolo de hojas de *Cucurbita* se extrajo la menor cantidad de ADN (15ng/ul) (Figura 3.12). Debido a ello, el protocolo de extracción implementando en las accesiones del Banco de Germoplasma fue el de Potosí et al. (2006) con modificaciones en este trabajo.

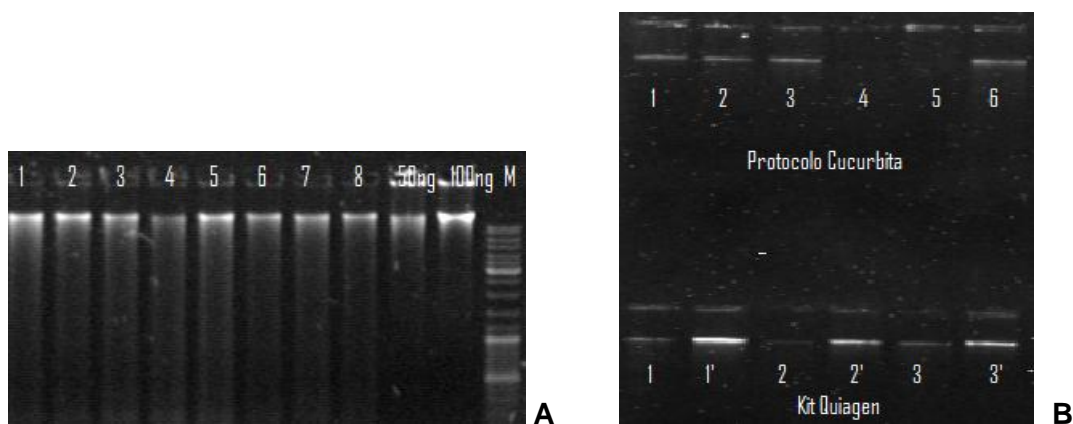


Figura 3.12. Visualización del ADN genómico de *G. angustifolia* **A.** mediante el protocolo de micro extracción de Dellaporta (1983) con modificaciones para arroz y posteriormente modificado para *G. angustifolia* por Potosí et al. (2006). **B.** mediante kit de Quiagen y protocolo de *Cucurbita* (Brown & Myers 1998).

#### 3.3.2. Extracción Amplificación de las regiones microsatélites.

De los 26 microsatélites evaluados se lograron estandarizar en *G.angustifolia* 10 loci; en *G. superba*, *G. amplexifolia* y *G. weberbaueri* 7 loci; en *G. paniculata*, *G. glauca* y *G. uncinata* 8 loci; en *B. vulgaris*, 18 loci y en *B. bambos*, 12 loci (Tabla 3.4).

Las amplificaciones en geles de agarosa oscilaron entre 150 y 500 pb y en los geles de acrilamida se distinguieron alelos entre 101 y 500 pb (Figuras 3.12 3.13 y 3.14).

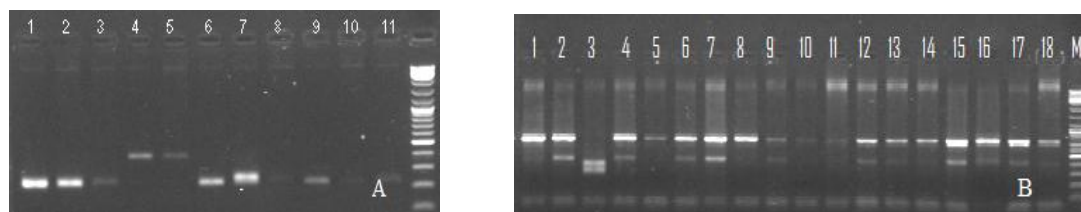


Figura 3.13. Amplificación de microsatélites. A. Amplificación del locus Bam 2-13 en *G. angustifolia* (1- 3, 6- 11) y *B. vulgaris* (4, 5). B. Bam 1-11 en *G. angustifolia* (1-18) y *B. vulgaris* (3).

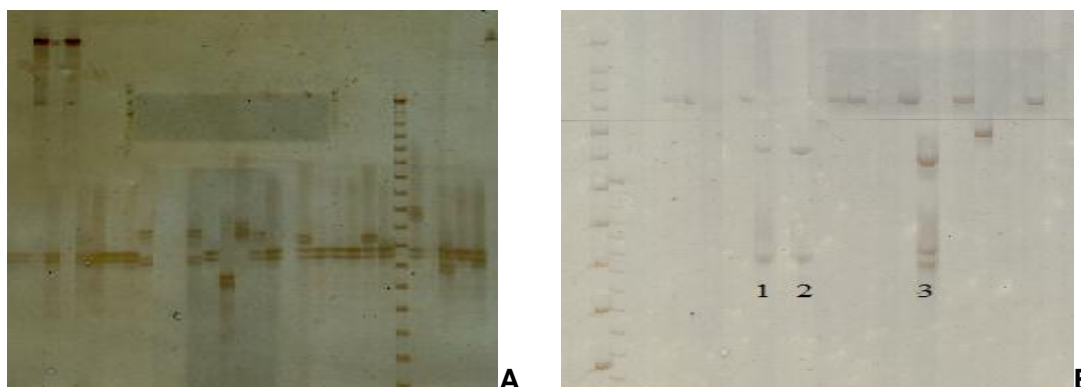


Figura 3.14. Visualización de geles de acrilamida al 4% para la identificación de los alelos de los loci A. Bam 2-13 y B. Bam 2-11(*Bambusa*: 1, 2, 3).

La amplificación de regiones microsatélites en especies del mismo género ha sido reportada en plantas como la yuca (Roa et. al. 2000), en arboles forestales (Dayanandan et al. 1997) y, al parecer, es muy común en las gramíneas. De hecho, dentro de la subfamilia Bambusoideae, Nayak & Rout (2005) también lograron amplificar 18 regiones microsatélites en diferentes especies del género *Bambusa*. Marulanda et al. 2007 probaron Single Sequences Repeats (SSR) de arroz y de caña de azúcar en *G. angustifolia*, todas pertenecientes a la familia Poaceae, obteniendo la amplificación exitosa de 37 de estas secuencias, lo cual indica la gran proximidad genética existente entre los géneros de esta familia, tal y como lo han reportado Ishii & McCouch (2000), Kresovich et al. (1995) y Zhao & Kochert (1992),

quienes han identificado secuencias de arroz capaces de amplificar en diferentes loci de maíz y bambúes.

Esta gran conservación de los loci microsatélites dentro de la familia Poaceae favorece el estudio de la variabilidad genética en especies en donde no se han desarrollado estos marcadores aún, ya que sería posible emplear aquellas secuencias SSR que han sido evaluadas, como las obtenidas en este estudio, en lugar de efectuar todo el proceso de diseño de librerías, ahorrándose tiempo y dinero, y a su vez, se obtendrían conocimientos sobre la diversidad genética en aquellas especies sobre las que se desconoce este aspecto, como el caso de la mayoría de bambúes. Debido a ello, se recomienda evaluar este nuevo juego de microsatélites en otras especies de la subfamilia Bambusoideae.

Respecto a los loci Bam 2-11 y Bam 2-8, aunque amplificaron en todas las especies de *Guadua* y *Bambusa*, presentaron un perfil de bandas (figura 16) en los geles de acrilamida similar a aquellos con un origen génico multilocus (Avise 1994). Sin embargo, sólo con el locus Bam 2-11 se lograron obtener bandas consistentes, analizables y reproducibles en todas las accesiones estudiadas, por lo cual se tuvo en cuenta para la caracterización del banco de *G. angustifolia* (Figura 3.15). De todas formas, se recomienda analizar nuevamente el diseño de los cebadores.

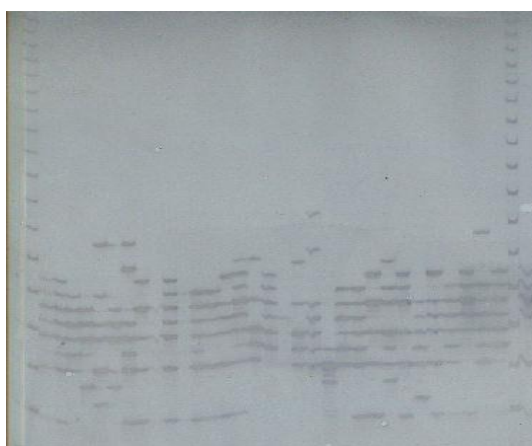


Figura 3.15. Perfil de bandas obtenidas con el locus Bam 2-11 en geles de acrilamida al 4%.

### 3.3.3 Evaluación de los microsatélites

La Tabla 4 muestra los microsatélites estandarizados óptimamente en cada especie de *Guadua* y *Bambusa*. Con los ocho loci amplificados en las 46 accesiones de *G. angustifolia*, se encontraron 69 alelos en total, con un promedio de  $8.625 \pm 3.662$  alelos por locus, variando entre 5 y 14 alelos y una riqueza alélica promedio de  $7.625 \pm 3.662$  (Tabla 5). Se obtuvieron 3 alelos nulos en los loci Bam 2-6, Bam 2-2 y Bam 2-7 uno en cada locus, respectivamente. Con el locus Bam 2-11, se obtuvieron perfiles en acrilamida de 5 a 9 bandas por individuo, encontrándose 20 alelos en las 46 accesiones de *G. angustifolia*. La frecuencia alélica mínima fue  $0.0109 \pm 0.0153$ , y la máxima fue de  $0.7609 \pm 0.0629$  para el alelo 228 del locus Bam 2-13 (Tabla 3.5).

Tabla 3.5. Microsatélites estandarizados óptimamente en cada especie de *Guadua* y *Bambusa*.

Especie	<i>G. angustifolia</i>	<i>G. superba</i>	<i>G. amplexifolia</i>	<i>G. paniculata</i>	<i>G. glauca</i>	<i>G. uncinata</i>	<i>G. weberbaueri</i>	<i>B. bambos</i>	<i>B. vulgaris</i>
Bam 2-1	X			X	X	X			
Bam 2-13	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-5	X	X	X		X	X	X		
Bam 2-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-3	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-6	X			X					X
Bam 1-11	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-7	X	X	X	X	X	X	X		
Bam 2-11	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-8	X								
Bam 1- 14									X
Bam 1- 15								X	X
Bam 11- 2									X
Bam 1-17								X	X
Bam 1-22								X	X

Bam 1-3									X	
Bam 1-5									X	
Bam 1-6								X	X	
Bam 16-2									X	
Bam 17- 2								X	X	
Bam 1-8								X	X	
Total	10	7	7	8	8	8	7	12	18	

En promedio, se observó un mayor número de homocigotos que de heterocigotos en los ocho loci. En el locus Bam 1-11, no se distinguieron individuos heterocigotos, mientras que en el locus Bam 2-1, la mayoría de individuos si lo fueron (Tabla 3.6).

El índice de contenido informativo polimórfico (PIC) ha sido ampliamente usado como un descriptor del grado de información que ofrece un determinado sitio del genoma. Valores de PIC superiores a 0.5 indican loci altamente polimórficos, como es el caso de los loci Bam 2-1, Bam 2-5, Bam 2-7, Bam 2-6 y Bam 1-11; medianamente informativos los que presentan valores entre 0.25 y 0.5, como el Bam 2-13, Bam 2-2 y Bam 2-3 y poco informativos los de valores inferiores a 0.25. Según este descriptor, ningún loci resultó monomórfico para las 46 accesiones de *G. angustifolia* y el locus más informativo fue el Bam 2-6 con un valor de PIC de 0.8517 (Figura 10). No obstante, este índice surgió de estudios en genética humana y pretendía evaluar la probabilidad de poder deducir, a partir del genotipo de un descendiente, de cuál de sus progenitores había recibido una característica particular (Myriam C. Duque com pers). Debido a ello, cuando se están estudiando poblaciones naturales o en su defecto individuos sin conocer sus parentales, este índice no es el más conveniente, además supone la ausencia de recombinación.

Tabla 3.6. Frecuencias alélicas obtenidas con los ocho loci en las 46 accesiones de *G. angustifolia*.

Alelos (pb)	Locus	Frecuencias alélicas
419	Bam 1-11	0.0435±0.0301
435	Bam 1-11	0.0217±0.0215

436	Bam 1-11	0.2174±0.0608
437	Bam 1-11	0.6304±0.0712
440	Bam 1-11	0.0652±0.0364
438	Bam 1-11	0.0217±0.0215
220	Bam 2-13	0.0217±0.0215
226	Bam 2-13	0.0217±0.0215
228	Bam 2-13	0.7609±0.0629
234	Bam 2-13	0.0326±0.0262
236	Bam 2-13	0.0870±0.0415
237	Bam 2-13	0.0217±0.0215
238	Bam 2-13	0.0109±0.0153
239	Bam 2-13	0.0109±0.0153
240	Bam 2-13	0.0109±0.0153
248	Bam 2-13	0.0109±0.0153
252	Bam 2-13	0.0109±0.0154
230	Bam 2-1	0.0870±0.0415
232	Bam 2-1	0.2283±0.0619
238	Bam 2-1	0.0109±0.0153
240	Bam 2-1	0.1087±0.0459
242	Bam 2-1	0.0109±0.0153
244	Bam 2-1	0.0652±0.0364
246	Bam 2-1	0.0109±0.0153
248	Bam 2-1	0.1522±0.0530
250	Bam 2-1	0.1630±0.0545
252	Bam 2-1	0.0109±0.0153
254	Bam 2-1	0.0543±0.0334
256	Bam 2-1	0.0109±0.0153

Continúa página siguiente

---

Continuación de la Tabla 3.6.

Alelos (pb)	Locus	Frecuencias alélicas
258	Bam 2-1	0.0761±0.0391
260	Bam 2-1	0.0109±0.0153
495	Bam 2-2	0.0652±0.0364
500	Bam 2-2	0.6848±0.0685
510	Bam 2-2	0.1522±0.0530
515	Bam 2-2	0.0326±0.0262
N	Bam 2-2	0.0652±0.0364
425	Bam 2-7	0.0435±0.0301
412	Bam 2-7	0.0109±0.0153
438	Bam 2-7	0.2500±0.0638
429	Bam 2-7	0.3913±0.0720
N	Bam 2-7	0.3043±0.0678
128	Bam 2-6	0.0217±0.0215
138	Bam 2-6	0.0652±0.0364
148	Bam 2-6	0.0217±0.0215
150	Bam 2-6	0.0109±0.0153
152	Bam 2-6	0.1196±0.0478
158	Bam 2-6	0.0109±0.0153
162	Bam 2-6	0.1522±0.0530
168	Bam 2-6	0.0543±0.0334
N	Bam 2-6	0.3043±0.0678
166	Bam 2-3	0.7609±0.0629
172	Bam 2-3	0.0217±0.0215
184	Bam 2-3	0.0435±0.0301
186	Bam 2-3	0.1087±0.0459

188	Bam 2-3	0.0435±0.0301
192	Bam 2-3	0.0109±0.0153
226	Bam 2-5	0.0109±0.0153
228	Bam 2-5	0.04891±0.0737
230	Bam 2-5	0.0109±0.0153
236	Bam 2-5	0.0109±0.0153
238	Bam 2-5	0.0109±0.0153
240	Bam 2-5	0.0326±0.0262
242	Bam 2-5	0.0217±0.0215
244	Bam 2-5	0.0326±0.0262
246	Bam 2-5	0.0326±0.0262
250	Bam 2-5	0.0543±0.0334
252	Bam 2-5	0.0326±0.0262
254	Bam 2-5	0.2174±0.0608
256	Bam 2-5	0.0435±0.0301

---



Tabla 3.7. Estimadores descriptivos de la diversidad genética obtenidos para 8 sistemas microsatélites evaluados en las accesiones de *G. angustifolia*.

Locus	A	A-1	ho	Ho	he	He	pD
Bam 2-5	13	12	0.4130	0.5870	0.2966	0.7034	0.8731
Bam 1-11	6	5	1.0000	0.0000	0.4518	0.5482	0.7520
Bam 2-13	11	10	0.5870	0.4130	0.5896	0.4104	0.5866
Bam 2-1	14	13	0.0435	0.9565	0.1349	0.8651	0.8918
Bam 2-2	5	4	0.6957	0.3043	0.5017	0.4983	0.7129
Bam 2-7	5	4	0.6522	0.3478	0.3103	0.6897	0.8434
Bam 2-6	9	8	0.8696	0.1304	0.1385	0.8615	0.9666
Bam 2-3	6	5	0.6304	0.3696	0.5951	0.4049	0.6270
Total	69	61	4.8913	3.1087	3.0183	4.9817	

Promedio 8.625±3.662 7.625±3.662 0.611±0.290 0.389±0.290 0.377±0.185 0.6227± 0.1852

Número de alelos por locus (A); riqueza alélica (A-1); homocigosidad observada (ho); heterocigosidad observada (Ho); homocigosidad esperada (he); heterocigosidad insesgada de Nei (He); contenido informativo polimórfico (PIC); probabilidad de exclusión (I); poder de discriminación (pD).

La probabilidad de identidad (I) puede ser un mejor estimativo del grado de información de un sitio del genoma obtenido por medio de los SSR en poblaciones, ya que ésta indica que tan alto es la probabilidad de encontrar dos individuos al azar iguales en un locus en particular y por tanto, que tan discriminante es ese sitio. Además, no se basa en ningún supuesto, es una probabilidad. Entre más bajos sean los valores de I más informativos son los sitios estudiados mediante los microsatélites. Según este índice, el locus más informativo es el Bam 2-6 (0.0334), seguido por el Bam 2-1 (0.1082), y el menos informativo de los loci sería el Bam 2-13 (0.4134) (Figura 17).

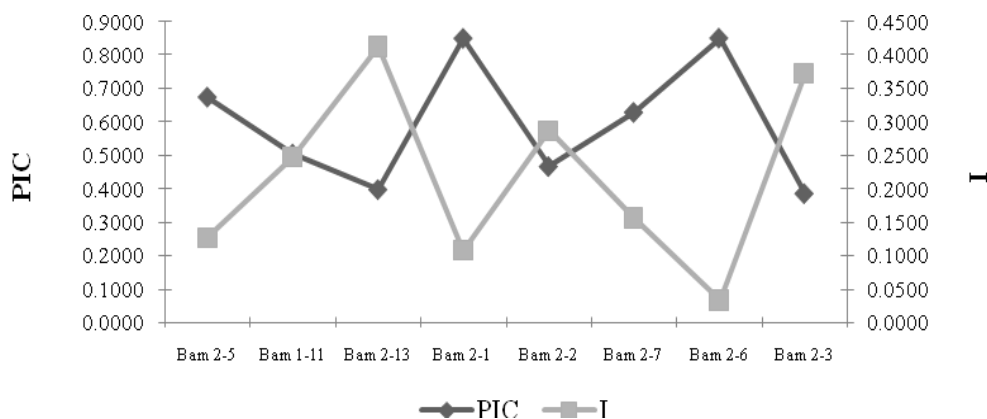


Figura 3.17. Comparación entre el contenido informativo polimórfico (PIC) y la probabilidad de identidad (I) obtenidos con ocho loci en las 46 accesiones de *G. angustifolia*.

A su vez, al calcular la probabilidad de identidad combinada, este descriptor permite evaluar que tan buena herramienta es el conjunto de todos los micros, en este caso,  $I_c$  fue de  $7.882 \times 10^{-07}$ , indicando que los ocho loci analizados para las 46 accesiones de *G. angustifolia* son lo suficientemente informativos para estudiar la diversidad genética en este banco. Posteriormente, se calcularon las frecuencias alélicas agrupando los biotipos y se encontraron cuatro alelos únicos para bicolor, nueve para macana, trece para cebolla, uno para cotuda, uno para castilla y uno para nigra (Tabla 3.8).

Tabla 3.8. Alelos únicos encontrados en los biotipos de *G. angustifolia* para los ocho loci.

Biotipo	#	Alelo	Frecuencia	Locus
	individuos			
Bicolor	5	226	0.1	Bam 2-5
Bicolor	5	246	0.1	Bam 2-1
Bicolor	5	150	0.1	Bam 2-6
Bicolor	5	158	0.1	Bam 2-6

Cebolla	20	236	0.025	Bam 2-5
Cebolla	20	238	0.025	Bam 2-5
Cebolla	20	240	0.075	Bam 2-5
Cebolla	20	172	0.05	Bam 2-3
Cebolla	20	192	0.025	Bam 2-3
Cebolla	20	242	0.025	Bam 2-1
Cebolla	20	252	0.025	Bam 2-1
Cebolla	20	256	0.025	Bam 2-1
Cebolla	20	237	0.05	Bam 2-13
Cebolla	20	240	0.025	Bam 2-13
Cebolla	20	248	0.025	Bam 2-13
Cebolla	20	419	0.10	Bam 1-11
Cebolla	20	412	0.025	Bam 2-7
Castilla	3	239	0.166	Bam 2-13
Cotuda	1	438	0.5	Bam 1-11
Macana	15	230	0.033	Bam 2-5
Macana	15	242	0.066	Bam 2-5
Macana	15	244	0.066	Bam 2-5
Macana	15	260	0.033	Bam 2-1
Macana	15	238	0.033	Bam 2-13
Macana	15	252	0.033	Bam 2-13
Macana	15	128	0.066	Bam 2-6
Macana	15	148	0.066	Bam 2-6
Macana	15	435	0.066	Bam 1-11
Nigra	1	238	0.5	Bam 2-1

---

bicolor (n=5), cebolla (n=20), macana (n= 15), castilla (1), nigra (1) y cotuda (1)

### 3.3.4. Diversidad de los SSR

De los 8 microsatélites ensayados en los 92 individuos colectados en el Valle del Cauca, 5 SSR fueron polimórficos (Tabla 3.9). Los sistemas microsatélites FJ444932 y FJ444933 resultaron monomórficos, por lo que fueron excluidos del análisis poblacional. En total se obtuvieron 24 alelos y se observaron alelos nulos en dos individuos con el SSR FJ444934. El número de alelos por locus varió entre 3 y 8, con un promedio de  $4,80 \pm 2,17$ . La diversidad genética la población total, medida como la heterocigosidad esperada insesgada promedio por locus fue de  $0,5319 \pm 0,185$ .

Tabla 3.9. Estimadores de la diversidad genética en cada uno de los SSR en la población global.

Locus	He	Ho	PIC	Número de alelos (A)	Riqueza alélica (A-1)
FJ444930	0,3436	0,4022	0,3161	4	3
FJ444931	0,7512	0,9022	0,7044	6	5
FJ444929	0,4878	0,5435	0,3726	3	2
FJ444934	0,7001	0,2472	0,6356	8	7
FJ476075	0,3766	0,4348	0,3388	3	2
Promedio	<b>0,5319 <math>\pm 0,185</math></b>			<b>4,8<math>\pm</math>2,17</b>	

He: Heterocigosidad insesgada de Nei (1978), Ho: Heterocigosidad observada, PIC: Índice de contenido informativo polimórfico (Bostein et al.1980), A: número de alelos por locus, A-1: riqueza alélica.

Los cinco loci no fueron igualmente polimórficos en las poblaciones, para Alcalá, Palmira y Ginebra sólo el 20% de los loci fueron polimórficos y en promedio el 55,45% de loci fueron polimórficos en las poblaciones (Tabla 9).

La riqueza alélica promedio por locus dentro de las poblaciones varió de 1,2 a 3,4. Los municipios de Alcalá, Palmira y Ginebra presentaron el menor número de alelos por locus (1,2), mientras que los municipios de Tuluá y Jamundí presentaron el mayor número (2,6 y 3,4) con un total de 13 y 17 alelos encontrados en las

poblaciones, respectivamente (Tabla 3). En Jamundí y el Toro se identificaron 4 y 1 alelos privados en los loci FJ444934 y FJ444929, respectivamente. La diversidad genética, medida en términos del promedio de las heterocigosidades esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), tuvo valores de 0,348 y 0,455, respectivamente.

En la tabla 3.10 se muestran los valores obtenidos de la heterocigosidad esperada y observada dentro de cada uno de los municipios asumidos como poblaciones. En la mayoría de los casos, excepto en El Toro, Candelaria y Sevilla, la heterocigosidad esperada fue menor que la heterocigosidad observada. Estos datos son consistentes con la prueba de precisión de cadenas Markovianas, la cual reveló desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en la mayoría de las poblaciones estudiadas (tabla 3.11).

Tabla 3.10. Estimadores de la diversidad genética en cada una de las poblaciones.

Población	$H_o$	$\pm SD$	$H_e$	$\pm SD$	%P	A	A/L	$\pm SD$
Tuluá	0,6725	$\pm 0,0565$	0,5288	$\pm 0,0579$	1,000	13,000	2,6000	$\pm 0,8944$
Yotoco	0,6000	$\pm 0,1095$	0,3429	$\pm 0,1400$	0,600	8,000	1,6000	$\pm 0,5477$
Darién	0,6000	$\pm 0,0730$	0,3176	$\pm 0,1297$	0,600	8,000	1,6000	$\pm 0,5477$
Restrepo	0,5200	$\pm 0,0999$	0,3156	$\pm 0,1298$	0,600	8,000	1,6000	$\pm 0,5477$
Puente Tierra	0,4000	$\pm 0,1265$	0,2400	$\pm 0,1470$	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,5477$
Guacarí	0,6000	$\pm 0,0828$	0,3231	$\pm 0,1319$	0,600	8,000	1,6000	$\pm 0,5477$
Ginebra	0,2000	$\pm 0,1033$	0,1200	$\pm 0,1200$	0,200	6,000	1,2000	$\pm 0,4472$
Versalles	0,4000	$\pm 0,0980$	0,2222	$\pm 0,1361$	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,5477$
Anserma Nuevo	0,4000	$\pm 0,0828$	0,3297	$\pm 0,1217$	0,800	10,000	2,0000	$\pm 0,7071$
Toro	0,4000	$\pm 0,1549$	0,4667	$\pm 0,1929$	0,600	10,000	2,0000	$\pm 1,0000$
Candelaria	0,2000	$\pm 0,1265$	0,3333	$\pm 0,2108$	0,400	9,000	1,8000	$\pm 1,3038$
Palmira	0,2000	$\pm 0,1265$	0,1333	$\pm 0,1333$	0,200	6,000	1,2000	$\pm 0,4472$
Vijes	0,6000	$\pm 0,1549$	0,4333	$\pm 0,1795$	0,600	8,000	1,8000	$\pm 0,8367$
El cerrito	0,7333	$\pm 0,1182$	0,5200	$\pm 0,1356$	0,800	10,000	2,2000	$\pm 0,8367$

Jamundí	0,5667	±0,0905	0,5606	±0,1597	0,800	17,000	3,4000	±2,4083
Sevilla	0,2333	±0,0785	0,2681	±0,1524	0,600	11,000	2,2000	±1,6432
Alcalá	0,2000	±0,1265	0,1333	±0,1333	0,200	6,000	1,2000	±0,4472
Rio Frio	0,7000	±0,1025	0,5000	±0,1273	0,800	11,000	2,2000	±0,8367
El Cairo	0,4000	±0,2191	0,4000	±0,2449	0,400	7,000	1,4000	±0,5477
Buga	0,6000	±0,1549	0,5000	±0,1394	0,800	10,000	2,0000	±0,7071
Buga Lagrande	0,4000	±0,2191	0,4000	±0,2449	0,400	7,000	1,4000	±0,5477
Cali	0,4000	±0,1549	0,2667	±0,1633	0,400	7,000	1,4000	±0,5477
<b>Media</b>	<b>0,4557</b>	<b>±0,1209</b>	<b>0,3480</b>	<b>±0,1514</b>	<b>0,5545</b>	<b>8,8182</b>	<b>1,7818</b>	<b>±0,7930</b>

He: Heterocigosidad insesgada de Nei (1978), Ho: Heterocigosidad observada, %P: porcentaje de loci polimórficos, A: número de alelos por locus, A/L: número de alelos por locus.

Tabla 3.11. Resultados de prueba  $X^2$  para probar equilibrio Hardy-Weinberg por cada uno de los loci analizados.

Locus	Grados de libertad	Ji -cuadrado	Probabilidad	Significancia I 5%
MICRO G	6	5,828	0,443	ns
MICRO O	15	71,254	0,000	***
MICRO Z	3	2,005	0,571	ns
MICRO X	28	318,269	0,000	***
MICRO Y	3	5,325	0,149	ns

### 3.3.5. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

La AMOVA de la Tabla 3.12 mostró que el componente entre las poblaciones corresponde a un 34,225% de la varianza total. Este porcentaje de variación entre las poblaciones fue altamente significativo ( $p \leq 0,001$ , tabla 12), indicando que *G. angustifolia* en el Valle del Cauca tiene una estructura genética alta. Por otro lado, se observa que la diferenciación dentro de los individuos constituye el componente más alto de la varianza. A su vez, la variación intrapoblacional es muy baja, reflejada en los valores negativos no significativos obtenidos con el índice de fijación  $F_{IS}$  (Tabla 3.12 y 3.14). Por otra parte, cabe anotar la gran similitud entre los valores obtenidos en la AMOVA de ambos modelos evolutivos: Slatkin (1995; Tablas 12 y 13) y Wright (1935; Tablas 3.14 y 3.15).

Tabla 3.12. AMOVA de tres niveles realizada mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{ST}$ ).

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	21	25395,391	136,352	34,225
Entre individuos dentro de poblaciones	70	7265,728	-156,267	-39,224
Dentro de individuos	92	38464,000	418,313	104,999
Total	183	71125,119	398,398	

Tabla 3.13. Índices de fijación estimados mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{ST}$ ).

Índices de Fijación	Valor	Valor p
$F_{IS}$	-0,59634	1,00000
$F_{ST}$	0,34225	0,00000
$F_{IT}$	-0,04999	0,92921

Tabla 3.14. AMOVA de tres niveles realizada mediante el modelo de Wright (1935).

Fuente de Variación	G.L.	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	21	92,683	0,489	35,994
Entre individuos dentro de poblaciones	70	32,554	-0,395	-0,291
Dentro de individuos	92	116,000	1,265	93,091
Total	183	241,238	1,359	

Tabla 3.15. Índices de fijación estimados mediante el modelo de Wright (1935).

Índices de Fijación	Valor	Valor p
$F_{IS}$	-0,45442	1,00000
$F_{ST}$	0,35994	0,00000
$F_{IT}$	0,06909	0,07594

Este alto porcentaje y la variación intrapoblacional muy baja, reflejada en los valores negativos no significativos obtenidos con el índice de fijación  $F_{IS}$  (Tablas 3.13 y 3.15) podrían indicar que posiblemente los diferentes loci analizados tienen dinámicas evolutivas diferentes, lo cual se registra cuando se observa que dos de ellos se desvían significativamente del equilibrio Hardy Weinberg (Tabla 3.11).

Considerando que el componente variación entre individuos dentro de poblaciones es negativo debido a la variación entre loci dentro de individuos, se juntan estos dos niveles y se recalcula la AMOVA para el modelo evolutivo de Wright (1935; tabla 3.16) y de Slatkin (1995; tabla 3.17). Con estos ajustes, los valores de  $R_{ST}$  Y  $F_{ST}$



son similares señalando diferenciación genética alta entre las poblaciones del Valle del Cauca.

Tabla 3.16. AMOVA de dos niveles realizada mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{ST}$ ).

<b>Fuente de Variación</b>	<b>G.L.</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Componentes de Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
Entre poblaciones	21	25395,4	1209,304	106,380	27,371%
Entre individuos dentro de poblaciones	162	45729,7	282,282	282,282	72,629%
Total	183	71125,1		388,662	

Tabla 3.17. AMOVA de dos niveles realizada mediante el modelo de Wright (1935).

<b>Fuente de Variación</b>	<b>G. L.</b>	<b>Suma de Cuadrados</b>	<b>Cuadrados Medios</b>	<b>Componentes de Varianza</b>	<b>Porcentaje de variación</b>
Entre poblaciones	21	92,683	4,413	0,401	30,437%
Entre individuos dentro de poblaciones	162	148,554	0,917	0,917	69,563%
Total	183	241,237		1,318	

### 3.3.6. Relaciones genéticas entre los individuos

En el dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA realizado con las distancias genéticas calculadas mediante el coeficiente de Nei-Li (1979); se observa una tendencia a formarse grupos de individuos pertenecientes al mismo municipio (Figura 3.18).

En este primer estudio genético poblacional desarrollado mediante un marcador codominante para la especie *Guadua angustifolia*. Se investigó la diversidad genética en 22 localidades del Valle del Cauca, la cual fue medida en términos de riqueza alélica, obteniendo un total de 24 alelos para la población total y una riqueza alélica promedio de 8.81 alelos por locus por población (localidad). Comparando estos valores con un total de 16 alelos encontrados en 190 individuos (6.5 alelos en promedio en la población con el mayor número de individuos) en el estudio de Kaneko et al. (2008) en *Bambusa arnhemica* mediante microsatélites- bambú Australiano cuyo género está muy relacionado morfológicamente con el género *Guadua*, resulta ser un valor muy informativo. El estudio de Miyazaki et al. (2008) refuerza la gran riqueza alélica obtenida mediante los cinco loci en el Valle del Cauca. Ellos obtuvieron entre 2 y 8 alelos en 23 individuos con ocho loci diseñados para *Sasa nipponica* tomados de cuatro zonas diferentes en el Japón.

En los municipios de Alcalá, Palmira y Ginebra se obtuvo el promedio de alelos por locus más bajo, esto puede atribuirse a que los guaduales se encuentran en zonas altamente intervenidas por el hombre mediante la explotación cañera, lo cual ha ocasionado una reducción en el tamaño efectivo de los guaduales causando probablemente erosión genética. Estos tres guaduales plantean un nuevo estudio micro geográfico en el cual se tome un mayor número de individuos como muestras para conocer la dinámica poblacional de los mismos y evitar su pérdida definitiva.

Los resultados obtenidos indican que aunque hay una gran presión antropocéntrica en el Valle del Cauca sobre la *Guadua angustifolia*, principalmente por las actividades agrícolas, se mantiene una alta diversidad genética local, lo cual permite pensar potencialmente en programas de explotación industrial y mejoramiento

genético de esta especie para generar líneas elite en sus diferentes campos de utilidad teniendo en cuenta los resultados obtenidos, que sugieren ambientes heterogéneos en el desarrollo de la historia evolutiva y adaptativa de los rodales en las diferentes localidades del Valle del Cauca.

La evaluación de la diversidad genética de *Guadua angustifolia* Kunth del departamento de Arauca (Dorado M. 2008) mostró para 58 individuos distribuidos en ocho biotipos, una alta diversidad en la población total ( $H = 0.3717$ ) y dentro de las biotipos, además de una alta variabilidad entre los biotipos analizados ( $G_{ST} = 0.5396$ ). Estos valores son muy similares a los mostrados en este estudio con microsatélites.

Mediante la presente investigación, cada guadua ha quedado caracterizado genéticamente, lo que permitirá en el futuro la realización de un estudio fenológico local para establecer la relación entre los rodales de valor industrial, artesanal, comestible y ecológico haciendo uso de los marcadores moleculares desarrollados.

En resumen, los resultados producto del proyecto de investigación mostraron que el juego de microsatélites evaluados amplificaron en diferentes especies del género *Guadua* y en dos especies del género *Bambusa*, por lo que pueden resultar útiles para estudios en estas especies. Se recomienda evaluar el diseño de los cebadores de los microsatélites con origen génico multilocus (loci Bam 2-11 y Bam 2-8) y profundizar el estudio de sus patrones de bandas. Los ocho loci que amplificaron en *G. angustifolia* presentaron altos valores de polimorfismo, resultando con contenidos informativos suficientes para estudios intra e inter específicos y por ende útiles en estudios poblacionales.

Por otro lado, existe un grado diversidad genética alto en las poblaciones de *Guadua Angustifolia* ubicadas en el Departamento del Valle del Cauca. Esta diferenciación poblacional tan alta, posiblemente esté relacionada con separaciones en regiones o locales o asociadas a las diferentes cuencas hidrográficas ya que al parecer lo que existe es un “pool” genético con alta estructura poblacional. Aún más, existen algunas localidades que poseen un grado de diversidad más alto que las hace

sobresalir entre las otras. En cambio, los biotipos de *G. angustifolia* establecidos morfológicamente no se pudieron diferenciar a nivel molecular, pero si se obtuvieron bandas o alelos únicos en cada uno de ellos. Esto está de acuerdo con lo reportado por otros autores en el eje cafetero (Muñoz 2011; Muñoz y Londoño 2011 a, b).

La diversidad genética de *G. angustifolia* podría mostrar algún grado de asociación con distancia geográfica, por lo que se aconseja llevar a cabo estudios poblacionales a nivel nacional con el propósito de ampliar las colectas a aquellas zonas no estudiadas e implementar estrategias de conservación locales y ampliar el Banco de Germoplasma de *G. angustifolia*.

Dada la alta diversidad observada es recomendable:

1. Llevar a cabo la introducción de nuevo material genético de manera regulada, con el fin de evitar la pérdida de diversidad genética local, especialmente, en aquellas regiones genéticamente menos diversas.
2. Mantener los rodales en aquellas localidades con mayor grado de diversidad genética para garantizar la conservación de la misma e implementar la realización de diferentes pruebas para identificar aspectos de valor agregado en aquellas plantaciones con características de mayor diversidad genética.
3. Llevar a cabo la comparación de estos resultados con el análisis de poblaciones silvestres y cultivadas de otros departamentos vecinos como Quindío, Risaralda, Caldas, Tolima, Cauca y Nariño y utilizar otras combinaciones de iniciadores diferentes a los ya evaluados para llevar a cabo una caracterización más completa de la diversidad genética de este promisorio vegetal.

## **Agradecimientos**

Al Grupo de Investigación en Biotecnología y Medio ambiente de la Universidad Santiago de Cali, a la Universidad del Valle, al Instituto para la Investigación y Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca (INCIVA).y al Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.

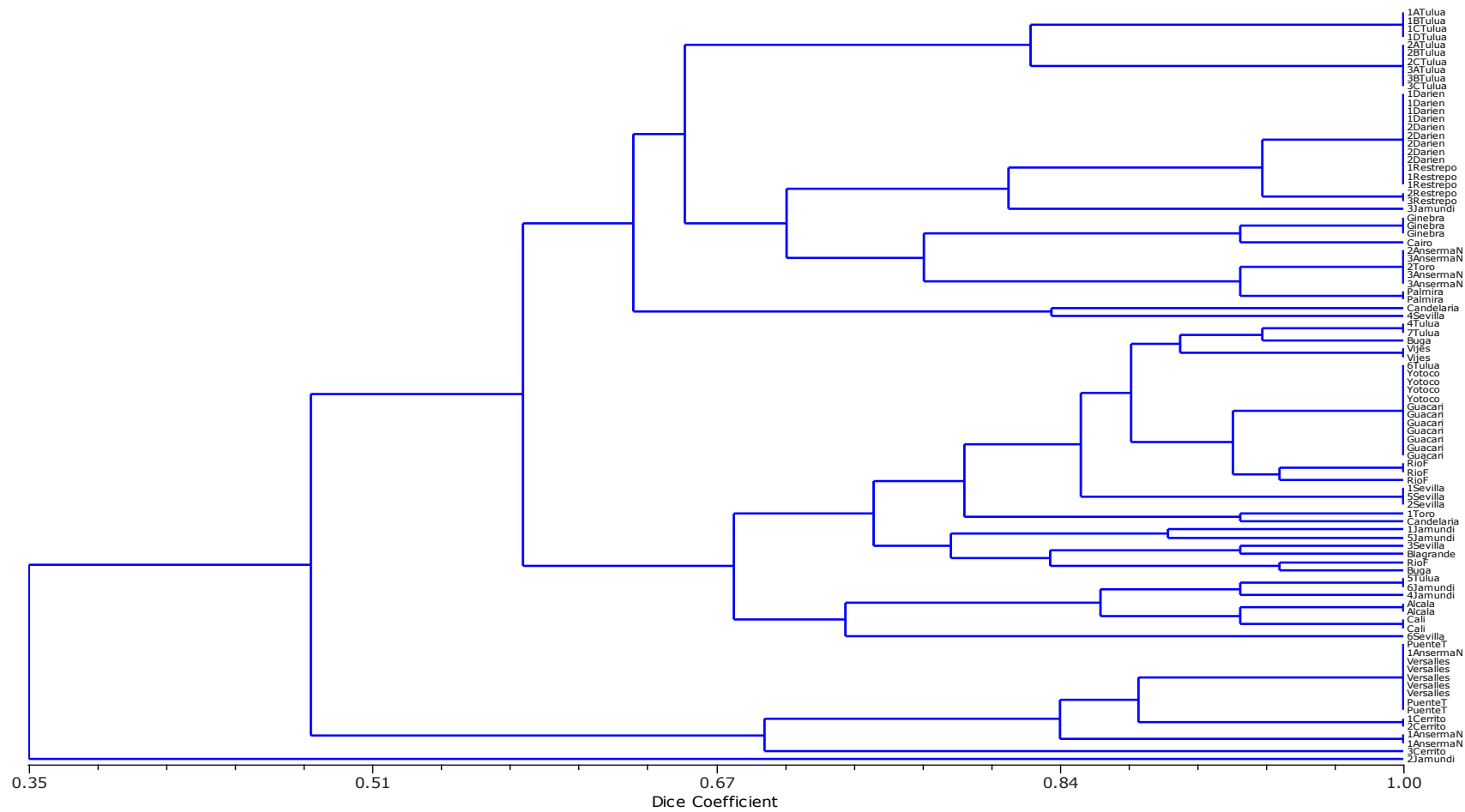


Figura 3.18. Dendrograma desarrollado mediante UPGMA de las distancias genéticas calculadas mediante el coeficiente de Nei-Li (1979)

## Referencias

- Agudelo, B. & Toro, I. Y. 1994. Evaluación del desarrollo de los bosques de *Guadua angustifolia* en la zona de jurisdicción de la CVC bajo diferentes condiciones de sitio, con fines de reforestación. Tesis. Universidad del Tolima. Facultad de Ingeniería Forestal, Ibagué. pp. 168.
- Armour J Al, Alegre S. A, Miles S., Williams L.J. & Badge R.M. 1999. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Goldstein DB, Schlotterer C (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, pp. 24–33.
- Awise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history & evolution*. New York, Chapman & Hall. 511p.
- Bassam, B. J., G. Caetano & P. M. Gresshorff. 1991. Fast and sensitive silver staining of DNA in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* 190: 80-83
- Botstein, D. R. L. White, M. Skolnick & R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Brown, R. N. & J. E. Myers. 1998. A simple protocol for isolating DNA from fresh *Cucurbita* Leaves. *Cucurbit Genetics Cooperative Report* 21: 46-47.
- Castaño, F. & R. D. Moreno. 2004. *Guadua para todos, cultivo y aprovechamiento*. Bogotá, Panamericana Formas e Impresos S.A. 187p.
- Castro, J., A. Pino, M. Hermida, C. Bouza, A. Riaza, I. Ferreiro, L. Sánchez & P. Martínez. 2006. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions *Aquaculture* 261: 1194–1203.
- Cruz, I. A. 1994. *La Guadua: Nuestro Bambú*. Armenia, Fudegraf. 293p.
- Chambers, G. K. & E.S. Macavoy. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126: 455–476.
- Chasan, R. 1991. Molecular biology and ecology: a marriage of more than convenience. *The Plant Cell*, 3 (11):1143-1145.

- Dayanandan, S, K. S. Bawa, & R. Kesseli. 1997. Conservation of microsatellites among Tropical Trees (Leguminosae). *American Journal of Botany* 84 (12):1658-1663
- Dellaporta, S., Wood, L. J. & J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprepation Version II. *Plant molecular Biology Reporter* (14): 19-21.
- Dorado M., E. J. 2008. Evaluación de la diversidad genética de *Guadua angustifolia* Kunth en el departamento de Arauca, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander Von Humboldt. 18 p.
- Eisen, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: *Microsatellites: Evolution and Applications* (eds Goldstein, D.B. & Schlotterer, C.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34–48.
- Estaoup, A., M. Solignac, M. Harry & J. M. Cornuet. 1993. Characterization of (GT)<sub>n</sub> and (CT)<sub>n</sub> microsatellites in two insect species: *Apis mellifera* and *Bombus terrestris*. *Nucleic Acids Res.* 21:1427–1431.
- Friar E. & Kochert G. 1991. Bamboo germplasm screening with nuclear restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics* 82: 697 – 703.
- Friar, E. & G. Kochert. 1994. A study of genetic variation and evolution of *Phyllostochys* (Bambusoideae : Poaceae) using nuclear restriction fragment length polymorphisms. *Theoretical and Applied Genetics.* (89): 265 - 270.
- Fischbeck, G. 1992. Barley cultivar development in Europe success in the past and possible changes in the future. In: Munck L (ed) *Barley genetics VI*, vol II. Munksgaard International Publishers Ltd, Copenhagen, 885–901.
- Fontdevila, A. & A. MOYA. 1999. *Introducción a la genética de poblaciones*. Madrid, Editorial Síntesis. 349p.
- Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. United Kingdom, Cambridge University Press. 617p.
- Guo S. W. & E. A. Thompson. 1992. Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles. *Biometrics.* 48: 361-72.
- Goldstein D.B. & Pollock D. 1997. Launching microsatellites: a review of mutation processes and methods of phylogenetic inference. *J. Hered.* 88:335–342.
- Goldstein, D. B. & C. Schlotterer. 1999. *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, New York. 350p.

- Hancock, J. 1999. Microsatellites and other simple sequence :genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). Microsatellites evolution and applications, Oxford University Press, New York, pp. 1-10.
- Hedrick, P. W & P. S. Miller. 1992. Conservation Genetics: Techniques and Fundamentals. Ecological Applications, 2 (1): 30-46.
- Heng, H.P., Yeho H.H., Tan C.K.C. & Rao A.N. 1996. Leaf isozyme polymorphisms in Bamboo species. Journal of the Singapore National Academy of Science. 22: 10-14.
- Hsiao, J. Y., & L. H. Rieseberg. 1994. Population genetic structure of *Yushania niitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan. Molecular Ecology 3:201-208
- Innis, M. A. & Gelfand D. H. 1990. Optimization of PCRs. pp. 3-12 in: PCR Protocols (Innis, Gelfand, Sninsky and White, eds.); Academic Press, New York.
- Ishii, T. & S. R. Mccouch. 2000. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. Theoretical and Applied Genetics (TAG) 100 (8): 1257-1266.
- Jones, D.A. 1972. Blood samples: Probability of discrimination. J. Forensic Sci. Soc.12:355-359.
- Judziewicz, E. J., Clark L. G., Londono X. & M. J. Stern. 1999.American Bamboos. Smithsonian Institution Press, Washington and London.
- Kaneko, S, D. C. Franklin, N. Yamasaki & Y. Isagi. 2008. Development of microsatellite markers for *Bambusa arnhemica* (Poaceae: Bambuseae), a bamboo endemic to northern Australia. Conserv. Genet 9:1311–1313.
- Kelchner, S. A. & Clark, L.G. 1997 Molecular evolutios and phylogenetic utility of the chloroplast rpl 16 intron in *Chusquea* and the Bambusiodeae (Poaceae). Molecular phylogenetics and Evolution. (8): 385 –397.
- Kobayashi, M. 1997. Phylogeny of word bamboos analysed by restriction fragment length polymorphisms of chloroplast DNA. In: Chapman G.P. ed. The bamboos. Linnean Society Symposium Series. UK.: Linnean Society of London: 61-81.
- Kondo, Y., M. Mori, T. Kuramoto, J. Yamada, J. S. Beckmann, D. Simonchazottes, X. Montagutelli, J. L. Guenet & T. Serikawa. 1993. DNA segments mapped by reciprocal use of microsatellite primers between mouse and rat. Mamm. Genome 4:571–576.



Kresovich, S., A. K. Szewc-Mcfadden, S. M. Bliet And J. R. Mcferson.1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). Theoretical and Applied Genetics 91: 206-211.

Litt, M. & Luty J. A: 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. Am J Hum Genet 44: 397–401.

Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae: Bambusoideae). Caldasia 16 (77):139-153.

Londoño, X. 1991. Estudio botánico, ecológico, silvicultural y económico-industrial de las Bambusoideae de Colombia. Cespicesia 16-17(59):51-78.

Londoño, X. 2004. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del Nuevo Mundo. En: Memorias III Congreso Colombiano de Botánica, Popayán Colombia.

Marulanda, M.L., P. Márquez, & X. Londoño. 2002. AFLP analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) in Colombia with emphasis on the Coffee Region. The Journal of the American Bambú Society 16(1): 32-42.

Marulanda. M. L., A. M. LOPEZ & J.L. CLAROS. 2007. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp. in Colombia using rice and sugarcane microsatellites. Crop Breeding and Applied Biotechnology 7: 43-51.

Mcdonald, D.B. & Potts WK (1997). DNA microsatellites as genetic markers for several scales. In: Mindell DP (ed.) Avian molecular evolution and systematics. Academic Press, San Diego, pp. 29–49.

Miller, Mark P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA), version 1.3. A Windows® program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data.<http://marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>

Muñoz, J. E., Londoño, X. 2011. Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero. Sexto informe Proyecto No. MADR2008M6336-3616. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.

Muñoz, J. E. 2011. Diversidad genética, estructura poblacional y selección de clones superiores de *Guadua angustifolia* Kunth en la eco-región cafetera de Colombia. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. pp. 151.

- Miyazaki, T., L. Neff, S. Tanaka, W. C. Horne & Roland Baron. 2008. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J. Cell Biol.* 160 (5): 709-718.
- Moore, S. S., L. L. Sargeant, T. G. King, J. S. Mattick, M. George & D. J. S. Hetzel. 1991. The conservation of dinucleotide microsatellites among mammalian genomes allows the use of heterologous PCR primer pairs in closely related species. *Genomics*, 10:654–660.
- Moran, C. 1993. Microsatellite repeats in pig (*Sus domestica*) and chicken (*Gallus domesticus*) genomes. *J. Hered.* 84:274-280.
- Morgante, M. & A.M. Oliveri. 1993. PCR-amplified microsatellites as markers in plant genetics. *Plant J* 3: 175–182.
- Muñoz, J. E. 2011a. Diversidad genética, estructura poblacional y selección de clones superiores de *Guadua angustifolia* Kunth en la eco-región cafetera de Colombia. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 151 p.
- Muñoz, J. E., Londoño, X. 2011b. Selección, genotipificación y multiplicación de materiales superiores de *Guadua angustifolia* Kunth con fines agroindustriales en el eje cafetero. Sexto informe Proyecto No. MADR2008M6336-3616. Ministerio de Agricultura y Desarrollo Rural.
- Muñoz, J. E., Posso A. M, Londoño X. & Betancur F. 2007. Evaluación de métodos de extracción de ADN de *Guadua angustifolia* y especies relacionadas para estudiar diversidad. Memorias IX Congreso Colombiano de fitomejoramiento y Producción de cultivos. San Juan de Pasto.
- Nayak, S & R. Rout. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in *Bambusa arundinacea* and cross species amplification in other bamboos. *Plant Breeding* 124: 599-602.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Nei, M & W.H. Li. 1979. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science* 76: 5269-5273.
- Olmos S. & Di Renzo M.. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte 6 Capítulo 2: “Estimación de variabilidad genética y análisis multivariado”: Pags.199-210. Ediciones INTA Cordoba. Argentina.

Ouborg, N.J., Y. Piquot & J. M. Van Groenendael. 1999. Population Genetics, Molecular Markers and the Study of Dispersal in Plants. *The Journal of Ecology*, 87(4): 551-568.

Paetkau, D & C. Strobeck. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489–495.

Park, S. D. E. 2001, Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [ Ph.D. thesis ] University of Dublin.

PARKER, P.G., A.A. SNOW, M.D. SCHUG, G.C. BOOTON & P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79 (2): 361-382.

Peakall, R & Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

Perez, C. A., Cardenas, H., Gonzalez, I. A. 2009. Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1375-1379.

Postosí, C. T., F. A. Vallejo & J. D. Palacio-Mejía. 2006. Estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en guadua en el departamento del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica* 55(2): 43-47.

Rao, A. N., Rao, V. R. 2000. Bamboo Conservation, Diversity, Ecogeography, Germplasm, Resource Utilization and Taxonomy. Proceeding of training course, 10-17 May 1998, Kuming and Xishuangbanna, Yunnan, China. Pp. 275.

Rao, V.R. & T. Hodgkin. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1–19.

Rassmann, K. C. Schlotterer, & D. Tautz, 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. *Electrophoresis*, 12: 113–118.

Rico, C., I. Rico, And G. Hewitt. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. *Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci.* 263:549–557.

Rohlf, F.J. 1996. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.02i. Exeter Publishing, Setauket, NY.

Romero, M., Cabrera, E., Ortiz, N. 2008. Informe sobre el estado de la Biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 186 p. Acceso electrónico:

[http://www.humboldt.org.co/download/Informe\\_Nacional\\_biodiversidad\\_I.pdf](http://www.humboldt.org.co/download/Informe_Nacional_biodiversidad_I.pdf).

Ruiz-Sánchez 2010. Delimitación de especies y posición filogenética del género de bambú americano *Otatea* (Poaceae: Bambusoideae). Tesis Doctoral, Instituto de Ecología, A.C. Departamento de Biología Evolutiva, Xalapa, Veracruz, México. 187p.

Sánchez, L. A., Del Real, A., Rodríguez – García, M. E. 2010. Caracterización morfológica de culmos de *Guadua angustifolia* Kunth por medio de microscopia electrónica de barrido. Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, México.

Stewart, J. 1999. Variación genética en árboles forrajeros. En: Congreso Latinoamericano de agroforestería para la producción animal sostenible. CIPAV Cali. ISBN 958-9386-22-9.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin v. 2.000. A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

SISAV. 2006. Sistema de Información de Sector Agropecuario del Valle del Cauca, Colombia.

<http://sisav.valledelcauca.gov.co/index.php?module=htmlpages&func=display&pid=35>

Slatkin, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics* 139: 457–462.

Slatkin, M. & Excoffier, L. 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*, 76: 377-383.

Schlotterer C 1998. Microsatellites. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. IRL Press, Oxford, pp. 237–261.

Stewart, J. 1999. Variación genética en árboles forrajeros. En: Congreso Latinoamericano de agroforestería para la producción animal sostenible. CIPAV Cali. ISBN 958-9386-22-9.

Tautz D., Trick M. & Dover G. 1986: Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322: 652–656.

Tautz, D., 1989. Hypervariability of simple sequences as a general source for polymorphic DNA markers. *Nucl Acids Res* 17: 6463–6471.

Torres, M.K. 2008. Evaluación del polimorfismo de marcadores microsatélites en *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) para la caracterización molecular de las accesiones del Banco de germoplasma de Bambusoideae del Jardín botánico Juan María Céspedes de Tuluá. Valle del Cauca. Trabajo de grado. Universidad del Valle. 63 pp.

Watanabe, M., Ito, M. & Kurita, S. 1994. Chloroplast DNA phylogeny of Asian Bamboos and its systematic implication. *Journal of Plant Research (Japan)*. 107(1087): 253 –261.

Wilson, P.J & J.Provan. 2003. Effect of Habitat Fragmentation on Levels and Patterns of Genetic Diversity in Natural Populations of the Peat Moss *Polytrichum commune*. *Proceedings: Biological Sciences*, 270 (1517): 881-886

Wright, S. 1935. The Analysis of Variance and the Correlations between Relatives with Respect to Deviations from an Optimum. *Journal of Genetics* 30: 243-56

Wu, J., John L. Vankat & Yaman Barlas. 1991. Effects of patch connectivity and arrangement on animal metapopulation dynamics: a simulation study. *Ecological Modelling*, 65: 221-254

Yahiaoui, S., E. Igartua, M. Moralejo, L. Ramsay, J. L. Molina-Cano, F. J. Ciudad, J. M. Lasa, M. P. Gracia & A. M. Casa. 2008. Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theor. Appl. Genet.* 116:271–282.

Yang, K., R.T. Pinker, Y. Ma, T. Koike, M.M. Wonsick, S.J. Cox, Y.-C. Zhang, And P. Stackhouse. 2008: Evaluation of satellite estimates of downward shortwave radiation over the Tibetan Plateau. *J. Geophys. Res.*, **113**, D17204, doi:10.1029/2007JD009736.

Yeh, F.C. & Boyle, T. J. B. 1997. Population genetic analysis of co-dominant and dominant markers and quantitative traits. *Belgian Journal of Botany* 129: 157.

Young, L.J. & E.A.D. Hammock. 2007. On switches and knobs, microsatellites and monogamy. *Trends in Genetics*, 23(5): 209-212.

Yuko Miyazaki, Y., N. Ohnishi, K. Hirayama & J. Nagata. 2008. Development and characterization of polymorphic microsatellite DNA markers for *Sasa senanensis* (Poaceae: Bambuseae). *Conserv. Genetics Technical Note*. DOI 10.1007/s10592-008-9575-4.

Zane, L., Bargelloni, L. & Patarnello, T. (2002). Strategies of microsatellite isolation: a review. *Molecular Ecology* 11, 1-16.

Zhao X, Kochert G. 1992. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 231:353-359.

Zhao, X. & G. Kochert, 1993. Phylogenetic distribution and genetic mapping of a (GGC)<sub>n</sub> microsatellite from rice (*Oryza sativa* L.). *Plant Mol Biol* 21: 607–614.

Zhou et al.(2010) Zhou, M., Lei, Z., Li, H., Yi, W., Zhang, Z., Guo, A. 2010. NMDA receptors-dependent plasticity in the phototaxis preference behavior induced by visual deprivation in young and adult flies. *Genes Brain Behav.* 9(3): 325--334.

### **Anexo 3.1. PROTOCOLO DE EXTRACCIÓN DELLAPORTA 1983 MODIFICADO PARA *Guadua angustifolia*.**

#### Buffer de Extracción

Materiales:

**Tris-HCl PH 8.0 100 mM**

**EDTA PH 8.0 50 mM**

**NaCl 500 mM**

**SDS 1,25**

**Bisulfito de Sodio 3.5 g/l**

Preparación:

Se precalienta el Buffer de Extracción a 65 ° C. Se marcan tres conjuntos de tubos Eppendorf de 1.5 ml. Se agregan 1 ml de Buffer de extracción precalentado a cada muestra, se incuban y agitan a 65 ° C por 45 minutos.

Se centrifuga a 14 rpm por 5 minutos, si es necesario dos veces para eliminar todos los sólidos. Se rescata el sobrenadante y se divide en partes iguales en dos tubos de 1.5 ml que se marcan como original y duplicado de la muestra. Se agregan 400 µl de acetato de potasio 5 M y se incuban por 30 minutos en baño de hielo. Nuevamente, se centrifuga a 4.000 rpm por 10 minutos. El sobrenadante se pasa a un tubo Eppendorf nuevo. Se centrifuga a 6.000 rpm por 4 minutos.

Se agrega un volumen igual de isopropanol a -20 ° C. y 1/10 de Acetato de Sodio 3 M., se incuban a -20 ° C por 30 minutos y se centrifugan a 12.000 rpm por 5 minutos. Se descarta el sobrenadante. Se lava el precipitado con 400 µl de etanol al 70%. Nuevamente, se centrifuga a 12.000 rpm por 3 minutos, se descarta el sobrenadante y se seca bien.

Luego, el precipitado se resuspende en 100 µl de Buffer TE 10:1. Se agrega un µl de RNAsa. Se deja toda la noche a 4 ° C. Se incuban por 30 minutos a 37 ° C. La calidad del ADN se evalúa en un gel de agarosa al 0.8%.

# CAPITULO 4. DISCUSIÓN GENERAL Y CONCLUSIONES

## Resumen

*Guadua angustifolia*, es una especie importante a nivel histórico - cultural en Colombia por su amplia utilidad en la industria en la construcción y en la conservación de cuencas y humedales. En esta tesis doctoral se ha estudiado la diversidad morfológica y genética de *G. angustifolia* en 22 rodales naturales del Valle del Cauca - Colombia. Se han estudiado los aspectos morfológicos, ecológicos, citogenéticos y moleculares que pueden explicar los procesos de diversificación encontrados en esta especie.

La *Guadua* es una especie adaptable a muy diversas condiciones; sin embargo, existen sitios con características que proporcionan un mejor ambiente y permiten su desarrollo y crecimiento óptimo. Dichas características ecológicas deben considerarse en los futuros planes de repoblación y manejo. En general, la altitud es un factor influyente en el desarrollo de esta especie. Este comportamiento es afectado por los regímenes de humedad regionales y por las características fisicoquímicas del suelo. También, afecta los fenotipos de los guaduales: cuanto mayor sea la altitud, más alta es la dureza y menor es el grosor de la línea nodal. La mayor longitud del internudo y el mayor grosor de la línea nodal, generan menor resistencia al ataque bacteriano.

Dentro de los rodales de guadual también existen diferencias y relaciones entre variables de importancia comercial como la correlación del diámetro internudo con las asociadas con la altura total del tallo, indicando que las poblaciones de bambú con paredes de mayor grosor poseen tallos de mayor altura y diámetro aún más grande. Además, la asociación de contorno del terreno con el grosor de la línea nodal sugiere que los tallos con diámetros mayores están relacionados con internudos ampliamente espaciados, y estos con tallos más altos, con una



probabilidad mayor de encontrarlos en terreno ondulado. La relación entre la base canular de la hoja, la altura, y la anchura y la longitud de la lámina foliar soporta la hipótesis de que estas asociaciones están relacionadas con la adquisición y el almacenamiento de nutrientes.

El DAP, la longitud del internudo (cm.), el grosor de la pared (cm.), y la dureza describen 55,3% de la variación del biotipo. Los biotipos más diferenciados son Castilla y cebolla, mientras que Macana es intermedio y más similar a Cebolla. DAP, la longitud del internudo y el grosor de pared diferencian significativamente a Cebolla de Castilla y Macana. El DAP y el grosor de la línea nodal de Cebolla son los más pequeños, Macana es intermedio y Castilla es el más grande. Bicolor es similar a Cebolla. Castilla se diferencia significativamente de Cebolla y Cebolla de Macana. Bicolor no muestra distancias de Fisher significativas con ninguno de los biotipos estudiados. Todos los biotipos de *G. angustifolia* mostraron diferencias significativas con las especies *G. uncinata* y *G. amplexifolia* pero no se diferencian de *Guadua glauca*, sugiriendo que no hay diferencias morfológicas entre *G. angustifolia* y *G. glauca*. *G. glauca* sólo se diferencia de *Guadua amplexifolia*.

La diversidad genética de *G. angustifolia* se evaluó en 22 rodales naturales del Valle del Cauca, usando 8 microsatélites diseñados para la especie, obteniéndose cinco marcadores altamente polimórficos y tres en equilibrio Hardy Weinberg. Sin embargo, la variabilidad genética entre individuos dentro de cada localidad es muy homogénea y la variación entre localidades fue significativa, indicando estructuración genética significativa en los rodales del Valle del Cauca.

Por lo tanto, en los programas de mejoramiento y conservación futuros deben considerarse las diferencias bióticas y abióticas de los sitios naturales y de cultivos, y las diferencias morfológicas y genéticas de cada rodal para producir plantas de calidad en las cadenas de producción o altamente adaptables a los sitios naturales de conservación.

**Palabras Clave:** *Guadua angustifolia*, conservación, polimorfismo, diversidad morfológica, biotipos, variedades, microsatélites, diversidad molecular, estructura genética.

#### 4.1. Introducción

*Guadua angustifolia*, bambú americano, es una especie importante a nivel histórico - cultural en Colombia por su amplia utilidad en la industria de la construcción y es clave en la conservación de cuencas y humedales. Debido a su utilización y al crecimiento de los asentamientos humanos, son pocas las hectáreas naturales de *G. angustifolia* existentes en nuestro país (31.000 ha), ocasionando pérdida de información biológica especialmente en su diversidad genética, la cual se desconoce para las poblaciones naturales. Adicionalmente, su propagación con fines económicos o de reforestación, se está realizando a través de métodos asexuales. En el Valle del Cauca, los guaduales naturales han sido desplazados por los cultivos de caña, reduciéndolos sustancialmente.

En la presente tesis doctoral se ha estudiado la diversidad morfológica y genética de *G. angustifolia* en 22 rodales naturales del Valle del Cauca - Colombia. Concretamente se han estudiado los aspectos morfológicos, ecológicos, citogenéticos y moleculares que pueden explicar los procesos de diversificación encontrados en esta especie. Dicho estudio se ha realizado a nivel microevolutivo (evolución y relaciones genealógicas de las poblaciones de una especie). En esta discusión se tratara de extrapolar las conclusiones obtenidas en la presente memoria doctoral a la especie *G. angustifolia*, sus variedades y biotipos, y de esta manera, se intenta dar respuesta a las preguntas previamente planteadas.

Con este objetivo, hemos dividido este capítulo en dos grandes apartados: (1) diversidad morfológica de *Guadua angustifolia* y (2) diversidad genética de rodales naturales de *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) en el Valle del Cauca- Colombia, para el uso sostenible y conservación de este recurso genético. En el primer apartado, se señala la congruencia de los caracteres morfológicos con los diferentes parámetros de crecimiento y desarrollo de los ecotipos introducidos, estableciéndose las condiciones abióticas y bióticas de desarrollo de esta especie y estimando la variabilidad fenotípica de los rodales parentales (fuentes semilleros).y de las colecciones existentes. Este primer apartado es de especial

importancia, ya que si se quieren estudiar los procesos que conducen a la diversificación de un grupo de plantas, primero se debe estudiar y conocer la diversificación morfológica de dicho grupo. En el segundo apartado se evaluó la diversidad genética de *G. angustifolia* en 22 rodales naturales del Valle del Cauca mediante el desarrollo de 8 microsatélites diseñados para la especie.

#### **4.2. Diversidad morfológica de *Guadua angustifolia***

En el año 2007, se inició con recolección y enriquecimiento de las colecciones del Jardín Botánico del Valle del Cauca y la granja El Bijal en el corregimiento de la Iberia-Tuluá, la caracterización morfométrica, el análisis de ADN y capacitación empresarial en el área administrativa y de formulación de proyectos, cultivo de la guadua, artesanías y construcciones.

El material colectado con los diferentes ecotipos de guadua del Valle del Cauca y áreas circunvecinas se sembró en el Jardín Botánico de Tuluá y la granja de la Iberia - El Bijal, Valle del Cauca, Colombia. Se caracterizaron morfológicamente 40 ecotipos y se hicieron ensayos de adaptabilidad con 20 de ellos.

En la tabla 2 se indicó el número de individuos muestreados por biotipo de la especie *Guadua angustifolia* en el Departamento del Valle del Cauca. En este muestreo (n = 66) se observó que el biotipo cebolla fue el más frecuente 60% aproximadamente. En cambio, en el departamento del Huila el biotipo macana fue el más abundante (Pérez R et al 2013).

##### **4.2.1 Condiciones ambientales para el desarrollo y cultivo de la guadua (*Guadua angustifolia*)**

La guadua posee amplio rango de distribución geográfica lo cual indica su adaptabilidad, hecho que está determinado por las condiciones edafoclimáticas (Condiciones interactuantes del tipo de suelo y características del clima). Observaciones técnicas demuestran que el buen desarrollo de la planta está

gobernado de manera directa por la calidad del sitio donde se desarrolle, la precipitación y la temperatura (Giraldo y Sabogal 1999).

La **temperatura** es uno de los factores climáticos limitante en la distribución geográfica de esta especie. El rango óptimo oscila entre 20 °C y los 26 °C. Cuando se cultiva en lugares donde los rangos de temperatura se alejan del óptimo, los diámetros y alturas de los tallos se reducen, afectándose normalmente el desarrollo vegetativo a temperaturas bajas.

Esta especie crece deficientemente en áreas donde la **precipitación** es inferior a los 1200 mm anuales. Los mejores rodales de guadua se presentan cuando el rango de precipitación se ubica entre los 2000 y los 2500 mm por año.

La **humedad relativa** es un factor muy importante en el desarrollo de la especie. La humedad que favorece el desarrollo de los bosques de guadua, está comprendida entre el 75% y el 85%.

La **luminosidad** para un excelente desarrollo de la guadua debe estar comprendida entre 1800 y 2000 horas/luz/año (aproximadamente de 5 a 6 horas/luz/día).

Los **vientos** en las zonas donde se encuentran los rodales de guadua en el Valle del Cauca tienen entre 4.4 m/seg y se les denominan brisas débiles, hasta 12,3 m/seg o sea brisas fuertes. Cuando los vientos superan los 22,6 m/seg, se comienzan a evidenciar daños mecánicos en los tallos de la guadua.

Las **nubes** son el conjunto visible de partículas minúsculas de agua o de hielo o de ambos a la vez, suspendidas en el aire. Los guaduales presentan mayor desarrollo cuando se tiene en promedio entre 1 y 4 octas con nubes

## **Suelos**

### **Características Físicas.**

Los suelos que más favorecen el desarrollo de la guadua son los areno-limosos, francos, francos-arenosos y franco-limosos. Los perfiles de suelos ideales son los que presentan texturas gruesas y medias. Suelos pesados o arcillosos no son buenos para el desarrollo de la plantas. La textura de los suelos en donde se ubican los guaduales del Valle son generalmente franco o franco arenoso o franco arcilloso, suelos efectivamente óptimos para el desarrollo de un programa de explotación agrícola en esta región geográfica. En suelos ricos en materia orgánica, con buenos drenajes, húmedos pero no inundables, es en donde se comporta mejor la guadua.

### ***Características Químicas***

El pH adecuado para el establecimiento de rodales de guadua es 5,5 a 6,0. Es decir, suelos moderadamente ácidos. La mayoría de los guaduales se encuentran en suelos derivados de cenizas volcánicas, con un porcentaje bajo de saturación de bases, pobres en fosforo y mediano en potasio. En general, en el Valle del Cauca, el pH es neutro o ligeramente ácido y se encuentra entre 5.4 y 6.8, concordando los sitios de pH más bajo (fuertemente ácido) con el encharcamiento de sus suelos, como son los caso de Santa Rosa de Cabal y La granja El Bijal en el municipio de Tuluá.

Los suelos donde se encuentran los rodales la guadua, el contenido de materia orgánica es alto que según Giraldo y Sabogal (1999) son suelos óptimos para su desarrollo. Sin embargo, son muy pobres en algunos elementos como el fosforo y el sodio y con altos contenidos en calcio, potasio, boro, hierro y cobre, elementos importantes en el desarrollo de la guadua, con altos contenidos de estos elementos. Otros elementos como el azufre en su contenido son muy variables. Algunos guaduales presentan altos contenidos y otros poco.

Los registros de la tabla 3 sobre características de los sitios de muestreo como altitud (m.s.n.m.), textura, pH y Materia orgánica (%) del suelo y relieve son similares a los encontrados por Castaño (2002a) y Castaño y Moreno (2004) sobre las

condiciones edafo-climáticas y dasométricas para los guaduales naturales del Valle del Cauca Colombia.

Se estimó el grado de correlación entre variables y análisis discriminante entre biotipos. Entre las asociaciones establecidas encontramos las siguientes:

(1) a mayor altitud sobre el nivel del mar, mayor dureza y menor grosor de la línea nodal. Estas características deben tenerse en cuenta puesto que un culmo de calidad debe tener mayor dureza y menor grosor de la línea nodal. La anatomía y morfología de la guadua, hacen pensar casi de inmediato que por la disposición de sus nudos y entrenudos, su trabajo a compresión es excelente. Nuestros campesinos y algunos constructores, han advertido esta propiedad de la guadua, empleándola como paral-columna, en la solución a sus viviendas y procesos constructivos. A pesar de la bondad que posee la guadua de tener características físicas que le permitan un comportamiento bueno a compresión, presenta el problema de todos los elementos esbeltos, el pandeo lateral, que ante solicitaciones de cargas verticales producen un efecto de deflexión sobre el elemento de guadua, restándole resistencia, además, de credibilidad en sus propiedades (Uribe y Duran 2002). Entonces guaduas con mayor dureza y menor grosor en la línea nodal evitan el pandeo lateral. Sin embargo, otros estudios no encuentran relación entre el diámetro del culmo y el espesor (De Navas Gutiérrez 2011).

Por otro lado, en Colombia la *Guadua angustifolia* crece entre los 0 y los 2000 m.s.n.m., pero el desarrollo óptimo se logra entre los 900 y los 1600 m.s.n.m. Este rango de altitud se encuentra en la mayoría de las áreas de cultivo del Valle Cauca, consiguiéndose los mejores rodales para la industrialización de la guadua en las zonas de ladera, aproximadamente a los 1600 m.s.n.m. (Tabla 1 capítulo 1). Estos resultados también se reportan en el estudio de Castaño (2002b). Dicho comportamiento se manifiesta en una alta cantidad de individuos en las clases diamétricas superiores; la resistencia mecánica y la densidad básica óptima. A su vez el estado fitosanitario fue el mejor. Aunque este último factor no tiene una relación directa con la altitud, aunque indirectamente dicha variable limita la

aparición de algunas especies de insectos perjudiciales, organismos patógenos y determinadas especies de aves, lo que puede favorecer un mejor estado fitosanitario de los guaduales en altitudes elevadas.

Pantoja y Acuña (2005) en su investigación encuentran que a medida que se aumenta la altitud se encuentran las guaduas más duras, así mismo con los suelos secos y que la razón del aumento de la dureza es debido a las temperaturas por debajo de la media y por esta razón, tiene un crecimiento más lento. El tipo de suelo es indispensable para las características de la guadua. La Guadua no crece en terrenos que posean un alto nivel freático, pero por ejemplo, en los bancos escarpados de los ríos, el complejo sistema de raíces y sus redes, pueden transportar por medio de ellas la humedad a los tallos secos localizados más arriba. Las relaciones establecidas en esta tesis son congruentes con los encontrados en la tesis de Pantoja y Acuña (2005).

Por lo tanto, en programas futuros de mejoramiento estas características fenotípicas deben tenerse en cuenta para producir una guadua de calidad en las cadenas productivas. Además, los cultivos industriales deben ubicarse en zona de mayor altitud.

(2) A mayor longitud del entrenudo y mayor grosor de la línea nodal menor resistencia al ataque de bacterias. Esto podría significar que se deben escoger rodales con longitud entre nudos y grosor de la línea nodal menores puesto que estos serán menos susceptibles al ataque de bacterias. De esta manera, se reducen las pérdidas de materiales, sobre todo en épocas secas, en las cuales se observa mayor ataque por parte de las bacterias.

(3) Por otro lado, al relacionar la densidad de los guaduales con los diámetros y las alturas de los individuos, se encontró lo siguiente: Existe la tendencia de la aparición de los mayores diámetros en los sitios con las densidades más bajas, es decir, se presenta una relación inversamente proporcional entre la densidad del guadua y los diámetros. Con relación a la altura no se pudo establecer una relación con la densidad ya que a densidades bajas se presentaron grandes y bajas alturas e igual



fenómeno con densidades altas. Estos resultados son similares a los encontrados por Castaño (2002b). Por esta razón, los guaduales deben mantener una distribución lo más homogénea posible de los individuos en su interior, ya que sitios totalmente despoblados (Claros) facilitan la aparición de individuos competidores del guadual; por el contrario sitios con altas densidades crean un ambiente de inaccesibilidad y la formación de guaduas con inclinaciones y diámetros reducidos es muy frecuente.

(4) Por último, con base en los análisis realizados, se caracterizaron los biotipos de *Guadua angustifolia* en el Valle del Cauca desde el punto de vista geográfico, ecológico y exomorfológico.

### **4.3. Diversidad genética de rodales naturales de *Guadua angustifolia***

#### **4.3.1. Introducción**

*Guadua angustifolia* es la especie que Kunth escogió como tipo del género *Guadua*. Su epíteto específico ‘angustifolia’ significa en latín ‘hoja angosta’ y describe una de sus características morfológicas más sobresalientes (Judziewicz et al. 1999). Esta ha sido de vital importancia en aspectos históricos y culturales en Colombia y Ecuador. Con ella los indígenas construyeron instrumentos, artesanías y viviendas, fue clave en los procesos de colonización en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca. Hoy en día, juega un importante papel económico, ya que de ella se extrae pulpa para papel y madera (Cruz 1994, Londoño 1991).

En Colombia existen cerca de 51 000 Ha en Guadua, de las cuales, 7 986 Ha se encuentran en el Departamento de Valle del Cauca, ocupando un 15.6% del total nacional (SISAV 2006). En escritos de la época de la colonización se comenta como el Valle del Cauca estaba completamente cubierto de guaduales, incluso se dice que los asentamientos indígenas de la región se escondían entre estos densos bosques cuando eran atacados por los españoles (Cruz 1994). Con el paso del

tiempo y el establecimiento de los asentamientos humanos y sus cultivos, especialmente el de la caña de azúcar, los guaduales han sido desplazados poco a poco. En la actualidad, el Valle del Cauca cuenta con unos pocos relictos naturales que están bajo el manejo de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca, CVC (SISAV 2006).

Hoy en día, con la implementación de la Guadua como un producto comercial, de sus cadenas productivas y el establecimiento de su cultivo bajo metodologías asexuales para su aprovechamiento (Castaño & Moreno 2004), se hace necesario el establecimiento de medidas de conservación de sus recursos genéticos silvestres, aún desconocidos (Rao & Hodgkin 2002). Es indispensable el conocimiento de la diversidad genética y de los diferentes acervos genéticos con los que cuenta *G. angustifolia* para una implementación adecuada de sistemas de selección de variedades y cultivares, y en los programas de fitomejoramiento, para así evitar en un futuro una posible erosión genética en sus cultivares, tal y como se observó en la cebada europea (Yahiaoui 2008), especie comercial en donde se han desarrollado cultivares de alto rendimiento a través de programas de selección y en donde se observó una reducción de la base genética de los cultivares actuales. Asimismo, el conocimiento y conservación de la diversidad genética de *G. angustifolia* es indispensable para la permanencia y evolución de la especie en estado natural (por ejemplo, para su resiliencia frente a cambios potenciales en el ambiente) (Frankhan et al. 2002, Chasan 1991, Fontdevila y Moya 1999, Hedrick & Miller 1992).

Con el fin de identificar genéticamente estos materiales seleccionados se utilizan técnicas moleculares entre las cuales se encuentran los microsatélites, que son secuencias repetidas; en los genomas de organismos superiores se encuentran tres tipos de secuencias de ADN repetido: satélites, minisatélites y microsatélites, con diferentes tamaños (Armour et al. 1999; Hancock 1999), los loci tienen alta tasa de mutación (Eisen 1999). Los microsatélites (Litt and Luty 1989), también conocidos como secuencias simples repetidas, SSRs (Tautz et al. 1986), repeticiones cortas en tándem (STRs) o polimorfismos en la longitud de la secuencia simple, SSLPs

(McDonald and Potts 1997), son la clase más pequeña de las secuencias simples de DNA repetitivo. Algunos (Armour et al. 1999) definen los microsatélites como repeticiones de 2-8 bp, otros (Goldstein and Pollock 1997) como 1-6 o igualmente 1-5 bp repetidas (Schlotterer 1998).

Respecto a la diversidad genética de guadua se han efectuado tres estudios desarrollados con el objetivo de evaluar la diversidad genética conservada en el Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes, Tuluá (Marulanda et al. 2002 y 2007) y la variabilidad molecular de *G. angustifolia* ha sido estudiada mediante evaluaciones preliminares con marcadores RAMs, Random Amplified microsatellites (Muñoz et al. 2007), con ocho loci microsatélites (Torres 2008, Pérez – Galindo et al. 2009) y sólo el estudio de Potosí et al. (2006) ha sido realizado en relictos naturales de *G. angustifolia*, aunque todos han tenido el objetivo común de evaluar la diferenciación genética entre los biotipos reportados.

En los estudios de Marulanda et al. (2002) mediante AFLPs y Marulanda et al. (2007) con sistemas microsatélites de arroz y caña de azúcar, respectivamente, encontraron una diversidad genética no significativa para la Guadua en el eje cafetero y no lograron caracterizar molecularmente los biotipos, mientras que en el estudio de Pérez – Galindo et al. (2009) mediante microsatélites diseñados específicamente para *G. angustifolia*, se encontró una diversidad genética significativa en las accesiones de esta especie en el Banco de Germoplasma, reportándose una correlación entre la distancias genéticas de las accesiones y las distancias geográficas de las mismas, planteando una posible diferenciación genética a nivel geográfico, sin embargo, tampoco se reportó una diferenciación genética entre los biotipos.

A diferencia de los AFLPs, los microsatélites, secuencias de no más de seis pares de bases de largo repetidas en tándem (Goldstein and Schlötterer 1999), son altamente polimórficos y de herencia codominante (Parker et al. 1998, Chambers and MacAvoy 2000), por lo que son muy utilizados en la identificación y seguimiento

de individuos, en estudios de asignación de parentales (Castro et al. 2006), en análisis de pedigrí, en estudios de dispersión de plantas (Ouborg et al. 1999), en sistemas de reproducción (Young and Hammock 2007), en flujo génico y migración, en introgresiones, en fitogeografía, diversidad genética, en el estudio de la estructura de las poblaciones (Wilson and Provan 2003) y en la caracterización de variedades o cultivares facilitando su identificación y selección (Frankhan et al. 2002, Chambers and MacAvoy 2000).

Por otra parte, en el estudio de Potosí et al. (2006) mediante RAPD, encontraron una alta diversidad genética en los relictos naturales de la cuenca Cauca, y a su vez, lograron caracterizar y diferenciar genéticamente los biotipos. Debido a los resultados contrastantes de estos estudios se hace más enfático profundizar en esta área de la biología de *G. angustifolia* y al mismo tiempo resulta conveniente llevar a cabo la evaluación de la diversidad genética en el Valle del Cauca y como esta puede estar posiblemente correlacionada con variables eco geográficas, ya que hasta el momento se cuenta con este conocimiento en los departamentos del Cauca, Quindío, Caldas y Risaralda.

En este estudio se realizó por primera vez la estimación de la diversidad genética en los relictos naturales de *G. angustifolia* en el Valle del Cauca mediante marcadores microsatélites (SSR) diseñados específicamente para la especie, siendo los primeros en ser reportados en el GenBank (Pérez-Galindo et al. 2009). Este conocimiento permitirá un mejor establecimiento, planteamiento y ejecución de medidas de conservación viables para *G. angustifolia*, así como la base para los programas de fitomejoramiento de la misma.

El ADN se extrajo mediante el protocolo de micro extracción de Dellaporta (1983) con modificaciones para arroz y posteriormente, modificado para *G. angustifolia* por Potosí et al. (2006, Anexo 4.1.). La evaluación se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8 %, teñidos con bromuro de etidio, cargando 2 ul de ADN y 2 ul de buffer blue juice, a 48 voltios por 30 minutos; se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Fotodyne Inc). La cuantificación se llevó a cabo

en un espectrofotómetro multifuncional Genius TECAN, Austria, a 260 nm y en geles de agarosa mediante comparación con ADN lambda (Invitrogen).

A partir de los perfiles obtenidos en los geles de poliacrilamida, se establecieron visualmente los alelos de cada locus con base en su tamaño molecular (pb) usando como referencia los valores conocidos de los marcadores 10bp y 25 bp (Invitrogen Corp., Carlsbad, California). Posteriormente, para describir los genotipos se generó una matriz de presencia /ausencia (binaria) de alelos para cada microsatélite. Se contabilizó el número de alelos identificados por locus (A) y se estimaron sus frecuencias respectivas utilizando la plataforma SunOS 5.9 de SAS versión 9.1.3. (2011). Con estas se calcularon los siguientes índices de diversidad para cada sistema microsatélite: la riqueza alélica (A-1), la homocigosidad observada ( $h_o$ ) o número de homocigotos en cada locus, la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) o número de heterocigotos en cada locus, la heterocigosidad esperada insesgada de Nei (1978) para cada locus  $He = 1 - \sum p_i^2$ , y el contenido informativo polimórfico (PIC) según Botstein et al.(1980),

$$PIC = 1 - \left( \sum_{i=1}^n p_i^2 \right) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$$

Donde,  $p_i$ = frecuencia del alelo i y  $p_j$ = frecuencia del alelo j; También se estimaron:

4. La probabilidad de identidad (I) definido por [Paetkau et al. \(1995\)](#), como la capacidad de que dos individuos al azar de la población dentro de un determinado locus tengan el mismo genotipo,

$$I = \sum p_i^4 + \sum_{j=1}^{i=n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$$

5. La probabilidad de identidad combinada ( $I_c$ ), basada en el concepto anterior pero combinando todos los loci, indica que tan buen descriptor de la diversidad son los microsatélites en conjunto,

$$I_c = \prod I_k$$

Donde K es cada locus.

6. El poder de discriminación ( $pD$ ) por locus (Jones 1972) que es la probabilidad de encontrar al azar dos individuos con genotipos diferentes dentro de una población con un determinado locus,

$$pD = 1 - I$$

La evaluación del contenido informativo de los microsatélites se llevó a cabo solamente en *G. angustifolia*, debido a los objetivos propuestos es este trabajo (Tabla 3).

Se evaluaron 8 de los 9 microsatélites reportados por Pérez – Galindo et al. 2009 (Tabla 1). Cada mezcla de reacción contenía 35 ng/ul de ADN, 10 mM Tris pH 9, 50 mM KCl, 2 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1 mM de cada dNTP, 0.072 μM de cada cebador y 3U Taq polimerasa (Unidad de Biotecnología CIAT), para un volumen final de reacción de 25 μl. Se usó un termociclador PTC- 100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, siguiendo el programa: 94 °C por 1 minuto (94 °C por 30 segundos, 54 °C por 45 segundos, 72 °C por 45 segundos) 35 veces, 72 por 10 minutos, 4 °C por cinco minutos.

Para el análisis estadístico de los datos se utilizaron los programas GENES ver 7.0 (Cruz 2008), TFPGA (Millar, Mark P 1997), GENALEX 6. (Peakall & Smouse 2006) y POPGEN 32 ver 1.31 (Yeh Francis C. 1997).

#### 4.3.2. Diversidad Genética

Para evaluar la diversidad genética de las poblaciones se estimó:

- k. **El número promedio alelos observados por locus ( $\bar{n}$ )** como la suma de todos los alelos detectados en todos los loci ( $n_i$ ), dividido por el número total de loci estudiados ( $L$ ).

$$\bar{n} = \frac{\sum_{i=1}^L n_i}{L}$$

- l. **El Número efectivo de alelos ( $A_e$ ):** Este estimador Indica el número de alelos que se esperaría en un locus, en cada población, si se asumiera que la población estudiada se comporta como una población ideal. Se calcula invirtiendo la medida de la homocigosidad esperada en un locus.

$$A_e = \frac{1}{1-h} = \frac{1}{\sum_{i=1}^n p_i^2}$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$ . Esta medida está afectada por la proporción de loci polimórficos, el número de alelos por locus polimórfico, y las frecuencias alélicas.

- m. **Número total de loci ( $L$ ):** Sumatoria de los loci estudiados en una población.
- n. **Porcentaje de loci polimórficos ( $P$ ):** En este estudio se considera a un locus polimórfico si el alelo más común presenta una frecuencia menor al 95% en la población bajo estudio.

$$P = [(\text{Número de Loci polimórficos}) / L] \times 100$$

o. **Heterocigosidad observada por locus ( $H_0$ ):**

$$H_0 = \frac{\text{Número de individuos heterocigotos}}{\text{Número total de individuos analizados}}$$

- p. **Heterocigosidad esperada por locus ( $H_j$ ):** El nivel de polimorfismo de cada locus se calculó mediante la heterocigosidad insesgada de Nei (1978) y el índice de contenido informático polimórfico (PIC) de Botstein et al. (1980), mediante los programas GenAlex (Peakall & Smouse 2006) y The Excel Microsatellite Tool Kit (Park 2001).

$$H_j = \frac{2n(1 - \sum_{i=1}^n p_i^2)}{(2n - 1)}$$

Donde  $p_i$  es la frecuencia del alelo  $i$  en el locus estudiado y  $n$  es el número de individuos muestreados por locus.

- q. **Contenido de información de un polimorfismo, “Polymorphism Information Content”,  $PIC$**  (Botstein et al. 1980).

$$PIC = (1 - \sum_{i=1}^n p_i^2) - 2 \sum_{i \neq j}^n p_i^2 p_j^2$$

Es una medida de la informatividad de un marcador genético, que depende del número de alelos para ese locus y de sus frecuencias relativas. Se define Informatividad de un marcador molecular como la probabilidad de que un descendiente de una pareja sea informativo, es decir, que se pueda deducir el origen parental de cada uno de los alelos de ese locus.



PIC junto con ENA sirven para evaluar la utilidad de un determinado locus de un marcador molecular para distinguir entre las UBC analizadas.

- r. **Heterocigosidad esperada (heterocigosidad media o diversidad genética media,  $H_e$  (Nei 1978)).** Expresa la heterocigosidad esperada en el locus medio si el apareamiento fuese al azar.

$$H_e = \frac{\sum_{j=1}^n H_j}{n} = \frac{\sum_{j=1}^n \sum_{i=1}^m (1 - p_{ij}^2)}{n}$$

Donde:

$H_j$ : Heterocigosidad esperada en un locus  $j$

$p_{ij}$ : frecuencia del alelo  $i$  del locus  $j$

$m$ : número de alelos en el locus  $j$

$n$ : número de loci considerados

- s. **Heterocigosidad esperada en cada subpoblación ( $H_s$ ):**

$$\hat{H}_s = \frac{\sum_{j=1}^S H_j}{S}$$

Donde  $H_j$  es la heterocigosidad esperada de locus  $J$  en la subpoblación  $S$ .

- t. **Heterocigosidad esperada en la población total ( $H_T$ ):** Se estima asumiendo que todas las subpoblaciones hacen parte de la misma unidad panmíctica y esta se comporta como una población ideal.

$$H_T = H_S + D_{ST}$$

Para evaluar el grado de diversidad genética en *G. angustifolia* se realizó una prueba de permutación empleando el algoritmo EM (Slatkin & Excoffier 1996) empleando el programa Arlequin 3.11 (Schneider et al. 2000) con un nivel de significancia de 0,05. Para probar estadísticamente el equilibrio Hardy- Weinberg en las poblaciones por locus se realizó una prueba de Ji - cuadrado mediante el programa GenAlex (Peakall and Smouse 2006).

#### **4.3.3. Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

La distribución de la variación genética en los municipios del Valle del Cauca se realizó mediante un AMOVA (Analysis of Molecular Variance) usando el programa Arlequin 3.11 (Schneider et al. 2000). Los índices de fijación se estimaron por localidad, mediante los modelos de evolución de SSR de alelos infinitos y de mutación por pasos ( $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , respectivamente). El valor de significancia de los estimadores fue de 0.05 y se obtuvo usando 10000 permutaciones.

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la diversidad genética en el Valle del Cauca, sin asumir agrupamientos a priori como el establecido por los municipios, se desarrolló un análisis de las relaciones genéticas existentes entre cada uno de los individuos. Se calculó la similitud genética entre parejas de genotipos mediante el coeficiente de Nei-Li (1979). Posteriormente, con la matriz de similitud genética, se llevó un análisis de agrupamiento a través del método UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Average) con el programa NTSYS-pc versión 2.02i (Rohlf, F.J. 1996), porque produce menor distorsión al compararse con la matriz de similaridad original (Olmos y Direnzo, 2004). Los grupos formados se confirmaron estadísticamente empleando el método bootstrap (re-muestreando 10000 veces) con el programa WinBoot.

Mediante el protocolo de micro extracción de ADN Dellaporta (1983), con modificaciones para arroz y posteriormente para *G. angustifolia* (Potosí et al. 2006),

se obtuvo el ADN con mejor calidad y mayor concentración (93,16ng/ul). Con el kit de extracción de Quiagen se alcanzó una concentración de 30ng/ul de ADN, mientras que con el protocolo de hojas de *Cucurbita* se extrajo la menor cantidad de ADN (15ng/ul) (Figura 12). Debido a ello, el protocolo de extracción implementando en las accesiones del Banco de Germoplasma fue el de Potosí et al. (2006) con modificaciones en este trabajo. Otros trabajos han encontrado ADN de buena calidad a concentraciones similares a la nuestra que oscilan entre 50 y 300 ng/μl (Posso 2011, Muñoz 2011).

La amplificación de regiones microsatélites en especies del mismo género ha sido reportada en plantas como la yuca (Roa et. al. 2000), en arboles forestales (Dayanandan et al. 1997) y, al parecer, es muy común en las gramíneas. De hecho, dentro de la subfamilia Bambusoideae, Nayak & Rout (2005) también lograron amplificar 18 regiones microsatélites en diferentes especies del género *Bambusa*. Marulanda et al. 2007 probaron Single Sequences Repeats (SSR) de arroz y de caña de azúcar en *G. angustifolia*, todas pertenecientes a la familia Poaceae, obteniendo la amplificación exitosa de 37 de estas secuencias, lo cual indica la gran proximidad genética existente entre los géneros de esta familia, tal y como lo han reportado Ishii & McCouch (2000), Kresovich et al. (1995) y Zhao & Kochert (1992), quienes han identificado secuencias de arroz capaces de amplificar en diferentes loci de maíz y bambúes.

Esta gran conservación de los loci microsatélites dentro de la familia Poaceae favorece el estudio de la variabilidad genética en especies en donde no se han desarrollado estos marcadores aún, ya que sería posible emplear aquellas secuencias SSR que han sido evaluadas, como las obtenidas en este estudio, en lugar de efectuar todo el proceso de diseño de librerías, ahorrándose tiempo y dinero, y a su vez, se obtendrían conocimientos sobre la diversidad genética en aquellas especies sobre las que se desconoce este aspecto, como el caso de la mayoría de bambúes. Debido a ello, se recomienda evaluar este nuevo juego de microsatélites en otras especies de la subfamilia Bambusoideae.

Respecto a los loci Bam 2-11 y Bam 2-8, aunque amplificaron en todas las especies de *Guadua* y *Bambusa*, presentaron un perfil de bandas en los geles de acrilamida similar a aquellos con un origen génico multilocus (Awise 1994). Sin embargo, sólo con el locus Bam 2-11 se lograron obtener bandas consistentes, analizables y reproducibles en todas las accesiones estudiadas, por lo cual se tuvo en cuenta para la caracterización del banco de *G. angustifolia* (Figura 3.4). De todas formas, se recomienda analizar nuevamente el diseño de los cebadores.

Con los ocho loci amplificados en las 46 accesiones de *G. angustifolia*, se encontraron 69 alelos en total, con un promedio de  $8.625 \pm 3.662$  alelos por locus, variando entre 5 y 14 alelos y una riqueza alélica promedio de  $7.625 \pm 3.662$  (Tabla 1.4). Se obtuvieron 3 alelos nulos en los loci Bam 2-6, Bam 2-2 y Bam 2-7 uno en cada locus, respectivamente. Con el locus Bam 2-11, se obtuvieron perfiles en acrilamida de 5 a 9 bandas por individuo, encontrándose 20 alelos en las 46 accesiones de *G. angustifolia*. La frecuencia alélica mínima fue  $0.0109 \pm 0.0153$ , y la máxima fue de  $0.7609 \pm 0.0629$  para el alelo 228 del locus Bam 2-13 (Tabla 3.4). En promedio, se observó un mayor número de homocigotos que de heterocigotos en los ocho loci. En el locus Bam 1-11, no se distinguieron individuos heterocigotos, mientras que en el locus Bam 2-1, la mayoría de individuos si lo fueron (Tabla 1.6). En otros estudios se encontraron entre 2 y 5 alelos por locus (Posso 2011 y Muñoz 2011), número inferior al encontrado en nuestro estudio, debido quizás a la cercanía geográfica de las muestras en estos trabajos, lo cual incrementa la identidad por distancia.

El índice de contenido informativo polimórfico (PIC) ha sido ampliamente usado como un descriptor del grado de información que ofrece un determinado sitio del genoma. Valores de PIC superiores a 0.5 indican loci altamente polimórficos, como es el caso de los loci Bam 2-1, Bam 2-5, Bam 2-7, Bam 2-6 y Bam 1-11; medianamente informativos los que presentan valores entre 0.25 y 0.5, como el Bam 2-13, Bam 2-2 y Bam 2-3 y poco informativos los de valores inferiores a 0.25. Según este descriptor, ningún loci resultó monomórfico para las 46 accesiones de *G. angustifolia* y el locus más informativo fue el Bam 2-6 con un valor de PIC de 0.8517

(Figura 10 capítulo 3). En investigaciones anteriores y usando los mismos marcadores microsatélites Torres et al. (2009) obtuvieron amplificación en ocho loci en *G. angustifolia* con valores de PIC entre 0.398 y 0.851, valores similares a los de este estudio y más altos que los obtenidos por Posso (2011) entre 0.152 y 0.70 y Muñoz (2011) con valores de PIC entre 0.133 y 0.62.

No obstante, este índice surgió de estudios en genética humana y pretendía evaluar la probabilidad de poder deducir, a partir del genotipo de un descendiente, de cuál de sus progenitores había recibido una característica particular (Myriam C. Duque com pers). Debido a ello, cuando se están estudiando poblaciones naturales o en su defecto individuos sin conocer sus parentales, este índice no es el más conveniente, además supone la ausencia de recombinación.

La probabilidad de pérdida alélica (L) es la probabilidad de que una muestra de N poblaciones no contenga un alelo con frecuencia poblacional P. Valores por debajo del 10% son considerados como bajos (Caujapé 2006). Para la mayoría de alelos encontrados, este valor resultó por debajo del 5% (datos no mostrados) dada su relativa alta frecuencia en la población; sin embargo, dada la baja frecuencia para cinco alelos encontrados, los valores de L se encontraron entre el 20 y 60%, indicando una baja probabilidad de encontrar éstos alelos en otras poblaciones muestreadas. La presencia de “alelos raros” o en bajas frecuencias es importante para la identificación y discriminación de materiales, pues se puede asignar estos alelos a alguna característica en particular (fenotípica, procedencia geográfica, entre otras), además, pueden ser de utilidad para una correcta genotipificación y discriminación de materiales seleccionados con características deseables.

La frecuencia mínima alélica ( $P_a$ ) hace referencia a la mínima frecuencia con la cual se tiene la certeza de estimar una frecuencia alélica en particular y depende del tamaño muestral. El valor obtenido fue de 0,021, indicando que el número de materiales colectados y utilizados en el presente trabajo es adecuado y brinda un buen soporte a la estimación de las frecuencias alélicas más bajas obtenidas en el

estudio. Ninguno de los alelos encontrados con los nueve marcadores microsatélites evaluados tuvo frecuencias menores al valor obtenido de Pa.

La probabilidad de alelos nulos ( $r$ ), si es negativa o muy baja, puede considerarse que la presencia de una sola banda corresponde a un homocigoto y no a un heterocigoto con un alelo nulo. En la mayoría de los casos este valor resultó negativo. Lo anterior brinda una alta confiabilidad para la lectura y asignación de genotipos a partir de los patrones de bandas obtenidos y confirma la posibilidad de que no se presentaron individuos heterocigotos con la presencia de alelos nulos. La determinación correcta de la presencia de alelos nulos es muy importante para análisis posteriores, dado que puede aumentarse la cantidad de homocigosis de manera equivocada y por lo tanto, afectar de gran manera los análisis de diferenciación, estructura poblacional y flujo genético.

De los 8 microsatélites ensayados en los 92 individuos colectados en el Valle del Cauca, 5 SSR fueron polimórficos (Tabla 3.8). Los sistemas microsatélites FJ444932 y FJ444933 resultaron monomórficos, por lo que fueron excluidos del análisis poblacional. En total se obtuvieron 24 alelos y se observaron alelos nulos en dos individuos con el SSR FJ444934. El número de alelos por locus varió entre 3 y 8, con un promedio de  $4,80 \pm 2,17$ . La diversidad genética la población total, medida como la heterocigosidad esperada insesgada promedio por locus fue de  $0,5319 \pm 0,185$ .

Los cinco loci no fueron igualmente polimórficos en las poblaciones, para Alcalá, Palmira y Ginebra sólo el 20% de los loci fueron polimórficos y en promedio el 55,45% de loci fueron polimórficos en las poblaciones (Tabla 3.9).

La riqueza alélica promedio por locus dentro de las poblaciones varió de 1,2 a 3,4. Los municipios de Alcalá, Palmira y Ginebra presentaron el menor número de alelos por locus (1,2), mientras que los municipios de Tuluá y Jamundí presentaron el mayor número (2,6 y 3,4) con un total de 13 y 17 alelos encontrados en las poblaciones, respectivamente (Tabla 3.3). En Jamundí y el Toro se identificaron 4 y 1 alelos privados en los loci FJ444934 y FJ444929, respectivamente. La diversidad

genética, medida en términos del promedio de las heterocigosidades esperada ( $H_e$ ) y observada ( $H_o$ ), tuvo valores de 0,348 y 0,455, respectivamente.

En la tabla 3.9 se muestran los valores obtenidos de la heterocigosidad esperada y observada dentro de cada uno de los municipios asumidos como poblaciones. En la mayoría de los casos, excepto en El Toro, Candelaria y Sevilla, la heterocigosidad esperada fue menor que la heterocigosidad observada. Estos datos son consistentes con la prueba de precisión de cadenas Markovianas, la cual reveló desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en la mayoría de las poblaciones estudiadas (tabla 10). Estos resultados son similares a los encontrados por otros autores (Posso 2011, Muñoz 2011).

La probabilidad de identidad ( $I$ ) puede ser un mejor estimativo del grado de información de un sitio del genoma obtenido por medio de los SSR en poblaciones, ya que ésta indica que tan alto es la probabilidad de encontrar dos individuos al azar iguales en un locus en particular y por tanto, que tan discriminante es ese sitio. Además, no se basa en ningún supuesto, es una probabilidad. Entre más bajos sean los valores de  $I$  más informativos son los sitios estudiados mediante los microsatélites. Según este índice, el locus más informativo es el Bam 2-6 (0.0334), seguido por el Bam 2-1 (0.1082), y el menos informativo de los loci sería el Bam 2-13 (0.4134) (Figura 3.10).

A su vez, al calcular la probabilidad de identidad combinada, este descriptor permite evaluar que tan buena herramienta es el conjunto de todos los micros, en este caso,  $I_c$  fue de  $7.882 \times 10^{-07}$ , indicando que los ocho loci analizados para las 46 accesiones de *G. angustifolia* son lo suficientemente informativos para estudiar la diversidad genética en las rodales naturales del Valle del Cauca. Posso (2011) reporta un  $I_c$  de  $4,114 \times 10^{-6}$ , indicando que utilizando los nueve marcadores analizados para las muestras evaluadas de *G. angustifolia* existe una probabilidad muy baja y cercana a cero de tomar dos individuos al azar que contengan el mismo genotipo y por lo tanto, son lo suficientemente informativos para estudiar la diversidad genética en el

eje cafetero. Esto significa que el grupo de microsatélites escogidos es útil para establecer diversidad génica y estructura poblacional.

Posteriormente, se calcularon las frecuencias alélicas agrupando los biotipos y se encontraron cuatro alelos únicos para Bicolor, nueve para Macana, trece para Cebolla, uno para Cotuda, uno para Castilla y uno para Nigra (Tabla 3.7). Este resultado sugiere que algunos alelos podrían servir para identificar los biotipos de *Guadua angustifolia*. Por lo tanto, se sugiere probar más microsatélites para aumentar la probabilidad de detectar alelos marcadores de biotipos.

La AMOVA de la Tabla 11 mostró que el componente entre las poblaciones corresponde a un 34,225% de la varianza total. Este porcentaje de variación entre las poblaciones fue altamente significativo ( $p \leq 0,001$ ), indicando que *G. angustifolia* en el Valle del Cauca tiene una estructura genética alta. Por otro lado, se observa que la diferenciación dentro de los individuos constituye el componente más alto de la varianza. A su vez, la variación intrapoblacional es muy baja, reflejada en los valores negativos no significativos obtenidos con el índice de fijación  $F_{IS}$  (Tablas 3.6 y 3.8). Por otra parte, cabe anotar la gran similitud entre los valores obtenidos en la AMOVA de ambos modelos evolutivos (Tablas 3.9 y 3.10).

Este alto porcentaje y la variación intrapoblacional muy baja, reflejada en los valores negativos no significativos obtenidos con el índice de fijación  $F_{IS}$  (Tablas 3.10 y 3.11) podrían indicar que posiblemente los diferentes loci analizados tienen dinámicas evolutivas diferentes, lo cual se registra cuando se observa que dos de ellos se desvían significativamente del equilibrio Hardy Weinberg (Tabla 3.10). Por otra parte, cabe anotar la gran similitud entre los valores obtenidos en la AMOVA de ambos modelos evolutivos (Tablas 3.10 y 3.11). Los resultados obtenidos están de acuerdo a lo reportado en estudios anteriores, donde la variación entre poblaciones fue el 7.15% de la variación total, entre individuos dentro de poblaciones la estimación de varianza dio un valor negativo por lo que se considera cero y el resto de la variación se debió a la varianza dentro de individuos (Muñoz 2011).



Considerando que el componente variación entre individuos dentro de poblaciones es negativo debido a la variación entre loci dentro de individuos, se juntan estos dos niveles y se recalcula la AMOVA (ver las tablas 3.11 y 3.12). Con estos ajustes, los valores de  $R_{ST}$  Y  $F_{ST}$  son similares señalando diferenciación genética alta entre las poblaciones del Valle del Cauca.

En el dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA realizado con las distancias genéticas calculadas mediante el coeficiente de Nei-Li (1979, Figura 3.6) se observa una tendencia a formarse grupos de individuos pertenecientes al mismo municipio. Esto indica una alta confiabilidad para los loci utilizados en el análisis de diversidad genética los materiales colectados y la efectividad de los marcadores moleculares microsatélites para el estudio realizado.

En este primer estudio genético poblacional desarrollado mediante un marcador codominante para la especie *Guadua angustifolia*. Se investigó la diversidad genética en 22 localidades del Valle del Cauca, la cual fue medida en términos de riqueza alélica, obteniendo un total de 24 alelos para la población total y una riqueza alélica promedio de 8,81 alelos por locus por población (localidad). Comparando estos valores con un total de 16 alelos encontrados en 190 individuos (6.5 alelos en promedio en la población con el mayor número de individuos) en el estudio de Kaneko et al. (2008) en *Bambusa arnhemica* mediante microsatélites- bambú Australiano cuyo género está muy relacionado morfológicamente con el género *Guadua*, resulta ser un valor muy informativo. El estudio de Miyazaki et al. (2008) refuerza la gran riqueza alélica obtenida mediante los cinco loci en el Valle del Cauca. Ellos obtuvieron entre 2 y 8 alelos en 23 individuos con ocho loci diseñados para *Sasa nipponica* tomados de cuatro zonas diferentes en el Japón.

En los municipios de Alcalá, Palmira y Ginebra se obtuvo el promedio de alelos por locus más bajo, esto puede atribuirse a que los guaduales se encuentran en zonas altamente intervenidas por el hombre mediante la explotación cañera, lo cual ha ocasionado una reducción en el tamaño efectivo de los guaduales causando probablemente erosión genética. Estos tres guaduales plantean un nuevo estudio

microgeográfico en el cual se tome un mayor número de individuos como muestras para conocer la dinámica poblacional de los mismos y evitar su pérdida definitiva.

Los resultados obtenidos indican que aunque hay una gran presión antropocéntrica en el Valle del Cauca sobre la *Guadua angustifolia*, principalmente por las actividades agrícolas, se mantiene una alta diversidad genética local, lo cual permite pensar potencialmente en programas de explotación industrial y mejoramiento genético de esta especie para generar líneas elite en sus diferentes campos de utilidad teniendo en cuenta los resultados obtenidos, que sugieren ambientes heterogéneos en el desarrollo de la historia evolutiva y adaptativa de los rodales en las diferentes localidades del Valle del Cauca.

La evaluación de la diversidad genética de *Guadua angustifolia* Kunth del departamento de Arauca (Dorado M. 2008) mostró para 58 individuos distribuidos en ocho biotipos, una alta diversidad en la población total ( $H = 0.3717$ ) y dentro de las biotipos, además de una alta variabilidad entre los biotipos analizados ( $G_{st} = 0.5396$ ). Estos valores son muy similares a los mostrados en este estudio con microsatélites.

Mediante la presente investigación, cada guadua ha quedado caracterizado genéticamente, lo que permitirá en el futuro la realización de un estudio fenológico local para establecer la relación entre los rodales de valor industrial, artesanal, comestible y ecológico haciendo uso de los marcadores moleculares desarrollados.

#### **4.4. Conclusiones**

La Guadua es una especie que se adapta y desarrolla en muy diversas condiciones; sin embargo, existen sitios con ciertas características que proporcionan un mejor ambiente y permiten su desarrollo y crecimiento óptimo. Dichas características ecológicas deben ser tenidas en cuenta en los futuros planes de repoblación y manejo de la especie.

En general la altitud es un factor que influye en el desarrollo de la especie Guadua angustifolia, lo que se refleja claramente en las variables de observación de la presente investigación. Se evidencia que con relación a la altitud los sitios de mejor desarrollo (Clase A), se ubican en un rango altitudinal aproximado de 1.300 á 1.500 m.s.n.m.; los guaduales de desarrollo medio (Clase B) se presentan entre los 1.000 y 1.300 m.s.n.m. y los de más bajo desarrollo (Clase C) por debajo de los 1.000 m.s.n.m. Es de tener en cuenta que dicho comportamiento es afectado por los regímenes de humedad de cada región y de las características físicas y químicas del suelo.

En la escogencia de los sitios más apropiados para cultivar la especie, se debe evaluar en conjunto toda una serie de variables medioambientales, correlacionando sus influencias sobre el comportamiento de las plantas; es claro que la influencia de algunas variables medioambientales se hace más notoria en el desarrollo de una especie vegetal que en otras.

La correlación del diámetro internudo con las mismas variables asociadas con la altura total del tallo, indica que las poblaciones de bambú con paredes de mayor grosor poseen tallos de mayor altura y diámetro aún más grande. Además, la asociación de contorno del terreno con el grosor de la línea nodal sugiere que los tallos con diámetros mayores están relacionados con internudos más ampliamente espaciados, y estos a su vez con tallos más altos, con una probabilidad más alta de encontrarlos en terreno ondulado.

Tanto la base canular hoja, la altura, y la anchura y la longitud de la lámina foliar soporta la hipótesis de que estas asociaciones están relacionadas con la adquisición y el almacenamiento de nutrientes indicados antes.

Cuanto mayor sea la altitud, la más alta es la dureza, y cuanto menor sea el grosor de la línea nodal. Por lo tanto, en los programas de mejora futuras deben tenerse en cuenta estas características fenotípicas para producir una planta de bambú calidad en las cadenas de producción.

La mayor longitud del internudo y cuanto mayor sea el grosor de la línea nodal, menor es la resistencia al ataque bacteriano. Esto podría significar que los bosques de bambú con una mayor longitud y grosor de línea nodal son más susceptibles al ataque bacteriano. Esto debe tenerse en cuenta al diseñar un sistema de gestión de bambú y un programa de mejora en la provincia del Valle del Río Cauca.

El DAP las variables (cm.), la longitud del internudo (cm.), el grosor de la pared (cm.), y la dureza describen 55,3% de la variación del biotipo. En el promedio, los biotipos más diferenciados son Castilla y cebolla, mientras que el biotipo macana es intermedio, que aparece más similar a la cebolla. DAP, la longitud del internudo y el grosor de pared diferencian significativamente a Cebolla de Castilla y Macana. El DAP y el grosor de la línea nodal de cebolla como el más pequeño en tamaño, macana como intermedio y castilla como el más grande. El biotipo bicolor es similar a cebolla.

El biotipo Castilla se diferencia significativamente de la cebolla y la cebolla a su vez de Macana. El biotipo Bicolor no muestra distancias Fisher significativas con alguno de los biotipos estudiados. Todos los biotipos de *G. angustifolia* mostraron diferencias significativas con las especies *G. uncinata* y *G. amplexifolia*. No se diferencian de *Guadua glauca*, lo que sugiere que no hay diferencias morfológicas entre *G. angustifolia* y *G. glauca*. *G. glauca* sólo se diferencia de *Guadua amplexifolia*.

Con el tiempo, las relaciones entre las variables morfológicas en la colección de herbario se modifican. Estas alteraciones pueden incluso invertir las relaciones tesis como se indica por los coeficientes de correlación para la variable grosor de la línea nodal. Una vez más, esto apunta hacia el hecho de que el uso de especímenes de herbario como referencias debe hacerse con más cuidado.

El análisis de los resultados producto del proyecto de investigación mostró que el juego de microsatélites evaluados amplificaron en diferentes especies del género *Guadua* y en dos especies del género *Bambusa*, por lo que pueden resultar útiles para estudios en estas especies. Se recomienda evaluar el diseño de los cebadores de los microsatélites con origen génico multilocus (loci Bam 2-11 y Bam 2-8) y profundizar el estudio de sus patrones de bandas. Los ocho loci que amplificaron en *G. angustifolia* presentaron altos valores de polimorfismo, resultando con contenidos informativos suficientes para estudios intra e inter específicos y por ende útiles en estudios poblacionales.

Se encontró una diversidad genética alta para los materiales evaluados del Valle del Cauca, lo que indica que a pesar del uso indebido, la tala indiscriminada y el agotamiento rápido del recurso, aún se conserva variación genética importante para el mantenimiento de la especie en esta zona.

Existe un grado diversidad genética alto en las poblaciones de *Guadua Angustifolia* ubicadas en el Departamento del Valle del Cauca. Esta diferenciación poblacional tan alta, posiblemente esté relacionada con separaciones en regiones o locales o asociadas a las diferentes cuencas hidrográficas ya que al parecer lo que existe es un “pool” genético con alta estructura poblacional. Aun más, existen algunas localidades que poseen un grado de diversidad más alto que las hace sobresalir entre las otras. En cambio, los biotipos de *G. angustifolia* establecidos morfológicamente no se pudieron diferenciar a nivel molecular, pero si se obtuvieron bandas o alelos únicos en cada uno de ellos.

La diversidad genética de *G. angustifolia* podría mostrar algún grado de asociación con distancia geográfica, por lo que se aconseja llevar a cabo estudios

poblacionales a nivel nacional con el propósito de ampliar las colectas a aquellas zonas no estudiadas e implementar estrategias de conservación locales y ampliar el Banco de Germoplasma de *G. angustifolia*.

#### **4.5. Recomendaciones**

Dada la alta diversidad observada es recomendable llevar a cabo la introducción de nuevo material genético de manera regulada, con el fin de evitar la pérdida de diversidad genética local, especialmente, en aquellas regiones genéticamente menos diversas.

Mantener los rodales en aquellas localidades con mayor grado de diversidad genética para garantizar la conservación de la misma e implementar la realización de diferentes pruebas para identificar aspectos de valor agregado en aquellas plantaciones con características de mayor diversidad genética.

A pesar de que el uso de los marcadores moleculares microsatélites fue adecuado para el estudio de diversidad genética y estructura poblacional, se recomienda realizar estudios que conduzcan a la generación y desarrollo de nuevos microsatélites en el Valle del Cauca y/o en otras zonas geográficas del país.

Dado que el presente estudio evaluó características de los materiales del Valle del Cauca ocurridas en el pasado reciente, pero reflejadas en la actualidad; es altamente recomendable la realización del mismo estudio de diversidad genética en aproximadamente diez años (dos generaciones), para realizar comparaciones y monitorear el estado de las poblaciones a través del tiempo. Además, otros estudios de diversidad genética y estructura poblacional que involucren representantes de poblaciones naturales de otras zonas geográficas del país deben ser realizados para concluir de manera más precisa sobre las fuerzas evolutivas que actúan sobre las poblaciones naturales de *G. angustifolia*.

Llevar a cabo la comparación de estos resultados con el análisis de poblaciones silvestres y cultivadas de otros departamentos vecinos como Quindío, Risaralda, Caldas, Tolima, Cauca y Nariño y utilizar otras combinaciones de iniciadores diferentes a los ya evaluados para llevar a cabo una caracterización más completa de la diversidad genética de este promisorio vegetal.

#### **4.6. Agradecimientos**

Al Grupo de Investigación en Biotecnología y Medio ambiente de la Universidad Santiago de Cali, a la Universidad del Valle, al Instituto para la Investigación y Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca (INCIVA).y al Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt

#### 4.7. Referencias

- Armour J A. L, Alegre S. A, Miles S., Williams L.J. and Badge R.M. 1999. Minisatellites and mutation processes in tandemly repetitive DNA. In: Goldstein DB, Schlotterer C (eds) *Microsatellites: evolution and applications*. Oxford University Press, Oxford, pp. 24–33.
- Avise, J. C. 1994. *Molecular markers, natural history & evolution*. New York, Chapman & Hall. 511p.
- Botstein, D. R. L. White, M. Skolnick & R.W. Davis. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32: 314-331.
- Castaño, F. 2002a. Definición técnica de un régimen de aprovechamiento de bosques de guadua (*Guadua angustifolia* Kunth), y su incidencia en la sostenibilidad, sanidad y rentabilidad del recurso. In *Experiencias en el Departamento del Valle del Cauca, Colombia*. Mayo 16-17, Semillero-Taller: Avances en la investigación sobre guadua. Pereira, Colombia. p. 1-10.
- Castaño, F. 2002b. “Manejo de Guaduales Plantados”. MSBC. GTZ – Minambiente – CARs. Armenia -- Quindío. Octubre 22 – 25.
- Castaño, F. & R. D. Moreno. 2004. *Guadua para todos, cultivo y aprovechamiento*. Bogotá, Panamericana Formas e Impresos S.A. 187p.
- Castro, J., A. Pino, M. Hermida, C. Bouza, A. Ríaza, I. Ferreiro, L. Sánchez & P. Martínez. 2006. A microsatellite marker tool for parentage analysis in Senegal sole (*Solea senegalensis*): Genotyping errors, null alleles and conformance to theoretical assumptions *Aquaculture* 261: 1194–1203.
- Caujape, J. 2006. *Brújula para botánicos desorientados en la genética de poblaciones*. EXEGEN Ediciones. Las Palmas de Gran Canaria. España. 132p.
- Cruz, I. A. 1994. *La Guadua: Nuestro Bambú*. Armenia, Fudegraf. 293p.
- Chambers, G. K. & E.S. Macavoy. 2000. *Microsatellites: consensus and controversy*. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126: 455–476.
- Chasan, R. 1991. Molecular biology and ecology: a marriage of more than convenience. *The Plant Cell*, 3 (11):1143-1145.



Dayanandan, S, K. S. Bawa, & R. Kesseli. 1997. Conservation of microsatellites among Tropical Trees (Leguminosae). American Journal of Botany 84 (12):1658-1663

Dellaporta, S., Wood, L. J. & J. B. Hicks. 1983. A plant DNA miniprep preparation Version II. Plant molecular Biology Reporter (14): 19-21.

De Navas Gutiérrez, Elvira. 2011. Aplicaciones estructurales de la guadua (*Guadua angustifolia* Kunth). Proyecto de estructura modular multifuncional en Colombia. Escuela Técnica Superior de Ingenieros de Montes, Universidad Politécnica de Madrid. 264p.

Dorado M., E. J. 2008. Evaluación de la diversidad genética de *Guadua angustifolia* Kunth en el departamento de Arauca, Colombia. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos "Alexander Von Humboldt. 18 p.

Eisen, J. A. 1999. Mechanistic basis for microsatellite instability. In: Microsatellites: Evolution and Applications (eds Goldstein, D.B. & Schlotterer, C.). Oxford University Press, Oxford, UK, pp. 34–48.

Fontdevila, A. & A. Moya. 1999. Introducción a la genética de poblaciones. Madrid, Editorial Síntesis. 349p.

Frankham, R., J. D. Ballou & D. A. Briscoe. 2002. Introduction to Conservation Genetics. United Kingdom, Cambridge University Press. 617p.

Giraldo Edgar, Sabogal, Aureliano. 1999. "La *Guadua angustifolia* Kunth en Colombia". Corporación Autónoma del Quindío. Subdirección de Recursos Naturales y Educación Ambiental. Centro Nacional para el estudio del Bambú-Guadua. 18 p.

Hancock, J. 1999. Microsatellites and other simple sequence :genomic context and mutational mechanisms. En: Goldstein D., Schlotterer C. (eds.). Microsatellites evolution and applications, Oxford University Press, New York, pp. 1-10.

Hedrick, P. W & P. S. Miller. 1992. Conservation Genetics: Techniques and Fundamentals. Ecological Applications, 2 (1): 30-46.

Heng, H.P., Yeh H.H., Tan C.K.C. & Rao A.N. 1996. Leaf isozyme polymorphisms in Bamboo species. Journal of the Singapore National Academy of Science. 22: 10-14.

Ishii, T. & S. R. McCouch. 2000. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. Theoretical and Applied Genetics (TAG) 100 (8): 1257-1266.

Judziewicz, E. J., Clark L. G., Londono X. & M. J. Stern. 1999. American Bamboos. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

Kaneko, S, D. C. Franklin, N. Yamasaki & Y. Isagi. 2008. Development of microsatellite markers for *Bambusa arnhemica* (Poaceae: Bambuseae), a bamboo endemic to northern Australia. *Conserv. Genet* 9:1311–1313.

Kresovich, S., A. K. Szewc-Mcfadden, S. M. Bliet And J. R. Mcferson. 1995. Abundance and characterization of simple-sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theoretical and Applied Genetics* 91: 206-211.

Litt, M. & Luty J. A: 1989. A hypervariable microsatellite revealed by in vitro amplification of a dinucleotide repeat within the cardiac muscle actin gene. *Am J Hum Genet* 44: 397–401.

Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (Poaceae: Bambusoideae). *Caldasia* 16 (77):139-153.

Londoño, X. 1991. Estudio botánico, ecológico, silvicultural y económico-industrial de las Bambusoideae de Colombia. *Cespedesia* 16-17(59):51-78.

Londoño Pava, Ximena. 1992. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del nuevo mundo. En: CESPEDESIA, Vol. 19. Nos 62-63 (enero – diciembre 1992). Cali, Colombia; p. 113.

Londoño, X. 2004. Distribución, morfología, taxonomía, anatomía, silvicultura y usos de los bambúes del Nuevo Mundo. En: Memorias III Congreso Colombiano de Botánica, Popayán Colombia.

Marulanda, M.L., P. Márquez, & X. Londoño. 2002. AFLP analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) in Colombia with emphasis on the Coffee Region. *The Journal of the American Bambú Society* 16(1): 32-42.

Marulanda. M. L., A. M. Lopez & J.L. Claro. 2007. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp. in Colombia using rice and sugarcane microsatellites. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 43-51.

Mcdonald, D.B. & Potts WK (1997). DNA microsatellites as genetic markers for several scales. In: Mindell DP (ed.) *Avian molecular evolution and systematics*. Academic Press, San Diego, pp. 29–49.

Miller, Mark P. 1997. Tools for Population Genetic Analyses (TFPGA), version 1.3. A Windows® program for the analysis of allozyme and molecular population genetic data. <http://marksgeneticsoftware.net/tfpga.htm>

Miyazaki, T., L. Neff, S. Tanaka, W. C. Horne & Roland Baron. 2008. Regulation of cytochrome c oxidase activity by c-Src in osteoclasts. *J. Cell Biol.* 160 (5): 709-718.

Muñoz, J. E. 2011. Diversidad genética, estructura poblacional y selección de clones superiores de *Guadua angustifolia* Kunth en la eco-región cafetera de Colombia. Tesis para optar al título de Doctor en Ciencias Agrarias. Facultad de Ciencias Agropecuarias. Universidad Nacional de Colombia sede Palmira. 151 p.

Muñoz, J. E., Posso A. M, Londoño X. & Betancur F. 2007. Evaluación de métodos de extracción de ADN de *Guadua angustifolia* y especies relacionadas para estudiar diversidad. Memorias IX Congreso Colombiano de fitomejoramiento y Producción de cultivos. San Juan de Pasto.

Nayak, S & R. Rout. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in *Bambusa arundinacea* and cross species amplification in other bamboos. *Plant Breeding* 124: 599-602.

Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.

nei, m & w.h. li. 1979. Mathematical model for studying genetic variations in terms of restriction endonucleases. *Proceedings of the National Academy of Science* 76: 5269-5273.

Olmos S. & Di Renzo M.. 2004. Biotecnología y Mejoramiento Vegetal. Parte 6 Capítulo 2: "Estimación de variabilidad genética y análisis multivariado": Pags.199-210. Ediciones INTA Cordoba. Argentina.

Ouborg, N.J., Y. Piquot & J. M. Van Groenendael. 1999. Population Genetics, Molecular Markers and the Study of Dispersal in Plants. *The Journal of Ecology*, 87(4): 551-568.

Pantoja Trujillo, N. H. y D. F. Acuña Jiménez. 2005. Resistencia al corte paralelo de la fibra de *Guadua angustifolia*. Unidad de Estructuras, Departamento de Ingeniería Civil y Agrícola, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. 94p.

Park, S. D. E. 2001, Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [ Ph.D. thesis ] University of Dublin.

Parker, P.G., A.A. Snow, M.D. Schug, G.C. Booton & P.A. Fuerst. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79 (2): 361-382.

Peakall, R & Smouse, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. Molecular Ecology Notes 6, 288-295.

Pérez R., J. J.; Villegas R., J. C.; Cerquera B., Y. y M. P. Cortes. 2013. Evaluación y documentación de prácticas sobresalientes sobre el manejo de la cosecha y maduración de la guadua en el Departamento del Huila. Fundación Para el Desarrollo de la Ingeniería (FUNDAIN), Ministerio de Agricultura y Desarrollo rural, Programa Nacional de Transferencia de Tecnología Agropecuaria (PRONATTA). Neiva Huila. 122p.

Perez, C. A., Cardenas, H., Gonzalez, I. A. 2009. Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae). Molecular Ecology Resources 9(5): 1375-1379.

Posso Terranova, A. M. 2011. Diversidad Genética Y Estructura Poblacional DE *Guadua angustifolia* Kunth en el eje cafetero colombiano. Trabajo de Grado para optar al título de Magister en Ciencias Agrarias con énfasis en Fitomejoramiento, Coordinación General de Posgrados, Facultad De Ciencias Agropecuarias, Universidad Nacional de Colombia- Palmira. 98p.

Postosí, C. T., F. A. Vallejo & J. D. Palacio-Mejía. 2006. Estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en guadua en el departamento del Cauca, Colombia. Acta Agronómica 55(2): 43-47.

Rao, V.R. & T. Hodgkin. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. Plant Cell, Tissue and Organ Culture 68: 1–19.

Rassmann, K. C. Schlotterer, & D. Tautz, 1991. Isolation of simple sequence loci for use in polymerase chain reaction-based DNA fingerprinting. Electrophoresis, 12: 113–118.

Rico, C., I. Rico, And G. Hewitt. 1996. 470 million years of conservation of microsatellite loci among fish species. Proc. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 263:549–557.

Rohlf, F.J. 1996. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.02i. Exeter Publishing, Setauket, NY.

Romero, M., Cabrera, E., Ortiz, N. 2008. Informe sobre el estado de la Biodiversidad en Colombia 2006-2007. Instituto de Investigación Alexander von Humboldt. Bogotá, D.C. Colombia. 186 p. Acceso electrónico: [http://www.humboldt.org.co/download/Informe\\_Nacional\\_biodiversidad\\_I.pdf](http://www.humboldt.org.co/download/Informe_Nacional_biodiversidad_I.pdf).

Sánchez, L. A., Del Real, A., Rodríguez – García, M. E. 2010. Caracterización morfológica de culmos de *Guadua angustifolia* Kunth por medio de microscopia

electrónica de barrido. Centro de Física Aplicada y Tecnología Avanzada, UNAM, México.

Schneider S, Roessli D, Excoffier L (2000) Arlequin v. 2.000. A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

SISAV. 2006. Sistema de Información de Sector Agropecuario del Valle del Cauca, Colombia.

<http://sisav.valledelcauca.gov.co/index.php?module=htmlpages&func=display&pid=35>

Slatkin, M. & Excoffier, L. 1996. Testing for linkage disequilibrium in genotypic data using the Expectation-Maximization algorithm. *Heredity*, 76: 377-383.

Schlotterer C 1998. Microsatellites. In: Hoelzel AR (ed) *Molecular genetic analysis of populations: A practical approach*. IRL Press, Oxford, pp. 237–261.

Tautz D., Trick M. & Dover G. 1986: Cryptic simplicity in DNA is a major source of genetic variation. *Nature*, 322: 652–656.

Torres, L. 2008. Evaluación del polimorfismo de marcadores microsatélites en *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) para la caracterización molecular de las accesiones del banco de germoplasma de bambusoideae del jardín botánico Juan María Céspedes de Tuluá- Valle del Cauca. Trabajo de grado para optar al título de Biólogo. Facultad de Ciencias. Universidad del Valle. Cali. 63p.

Uribe Vallejo, M. y A. D. Contreras. 2002. Estudio de elementos solicitados a compresión armados por tres guaduas. Tesis para optar al título de Ingeniero Civil, Departamento de Ingeniería Civil, Facultad de Ingeniería, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá D.C. 126 p.

Wilson, P.J & J. Provan. 2003. Effect of Habitat Fragmentation on Levels and Patterns of Genetic Diversity in Natural Populations of the Peat Moss *Polytrichum commune*. *Proceedings: Biological Sciences*, 270 (1517): 881-886

Yahiaoui, S., E. Igartua, M. Moralejo, L. Ramsay, J. L. Molina-Cano, F. J. Ciudad, J. M. Lasa, M. P. Gracia & A. M. Casa. 2008. Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theor. Appl. Genet.* 116:271–282.

Young, L.J. & E.A.D. Hammock. 2007. On switches and knobs, microsatellites and monogamy. *Trends in Genetics*, 23(5): 209-212.

Zhao X, Kochert G. 1992. Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice (*Oryza sativa* L.). *Mol. Gen. Genet.* 231:353-359.

**Anexos relacionados con los productos alcanzados durante el desarrollo de esta investigación.**

# VOLUME 5

## Biology and Taxonomy

### Table of Contents

Preface	1
Cyanogenic Glycosides in Bamboo Plants Grown in Manipur, India .....	2
The First Report of Flowering and Fruiting Phenomenon of <i>Melocanna baccifera</i> in Nepal.....	13
Species Relationships in <i>Dendrocalamus</i> Inferred from AFLP Fingerprints .....	27
Flowering gene expression in the life history of two mass-flowered bamboos, <i>Phyllostachys meyeri</i> and <i>Shibataea chinensis</i> (Poaceae: Bambusoideae).....	41
Relationships between <i>Phuphanochloa</i> (Bambuseae, Bambusoideae, Poaceae) and its related genera .....	55
Evaluation of the Polymorphic of Microsatellites Markers in <i>Guadua angustifolia</i> (Poaceae: Bambusoideae) .....	64
Occurrence of filamentous fungi on Brazilian giant bamboo.....	80
Consideration of the flowering periodicity of <i>Melocanna baccifera</i> through past records and recent flowering with a 48-year interval.....	90
Gregarious flowering of <i>Melocanna baccifera</i> around north east India Extraction of the flowering event by using satellite image data .....	100

# Evaluation of the Polymorphic of Microsatellites Markers in *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

Lorena Torres<sup>1</sup>, Diana Carolina Lopez<sup>2</sup>, Juan Diego Palacio<sup>2</sup>,  
Myriam Cristina Duque<sup>4</sup>, Carlos Andrés Pérez Galindo<sup>3</sup>,  
Iván Andrés González Vargas<sup>1</sup>, Heiber Cárdenas Henao<sup>1</sup>

1. Universidad del Valle, Grupo de Eco genética

2. Laboratorio de Biología Molecular Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt

3. Universidad Santiago de Cali

4. Centro Internacional de Agricultura Tropical

## Abstract

*Guadua angustifolia*, one of the world's 20 best bamboos known for their physical and mechanical properties and wide use in the construction industry. It has been used intensively in Colombia reducing native populations to a few hectares. So far, the only strategy for the conservation of genetic and phenotypic variability of the species, although unknown, is the existence of the Germplasm Bank of Bambusoideae located in the Botanical Garden Juan María Céspedes, Tuluá - Valle del Cauca, with accessions from 16 provinces of Colombia. In this study 26 microsatellite markers were designed and evaluated in 46 accessions of *G. angustifolia* to assess the molecular genetic variability of the accessions in the bank and get a new molecular tool enable to conduct population analysis, micro- evolutionary and taxonomic studies.

Amplification of 10 loci was obtained, two showed a pattern of bands with multilocus of genetic origin; in addition, the amplification of 14 loci in *Bambusa* and between seven or eight loci was reported in other species of *Guadua*. The eight loci standardized in *G. angustifolia* displayed values of PIC (Polymorphism Index Content) between 0,3981 and 0,8517, and probabilities of identity between 0,0334 and 0,4134 being medium and highly polymorphic. Therefore, these microsatellites are very good tools to carry out population analyses, taxonomic and microevolutionary studies in *G. angustifolia* and possibly in other species of the genus *Guadua* and *Bambusa*, knowledge that will contribute in the creation and implementation of strategies of conservation and sustainable use of the same ones, specially of the *Guadua* in Colombia.

## Introduction

*Guadua angustifolia* (Karl Sigismund Kunth 1822), American bamboo, is considered one of the 20 best in the world for their excellent physical and mechanical properties, their large size and its wide use in the construction industry (Villegas et al. 2003). In America is distributed from northern Mexico to northeastern Argentina (Young & Judd 1992, Londoño 1991). In Colombia, extends by three mountain ranges from north to south, at



elevations between 500 and 1 500 meters above sea level, dominating the inter-Andean valleys, where they form large associations called "Guaduales" (Londoño 1990).

Due to the continued use of this resource and the extensive colonization of human settlements, few hectares of natural *G. angustifolia* are left in our country (approximately 31 000 ha) (Castaño & Moreno 2004; Villegas et al. 2003; Cruz 1994). Therefore it is important the development and implementation of conservation strategies for this species. However, the required prior biological knowledge for its development such as the dynamics of their populations, their genetic diversity, taxonomy and evolution (Frankhan et al. 2002), which is lacking today (McNeely 1995; Stapleton & Ramanathan 1995; Bystrakova et al. 2003, 2004).

In 1987 the Bambusoideae Germplasm Bank at the Botanical Garden Juan María Céspedes was established, owned by the Institute for the Research and Preservation of Cultural and Natural Heritage of Valle del Cauca (INCIVA), with the aim of preserving bamboos and deepening their knowledge. This has accessions of *G. angustifolia* from 16 provinces of Colombia (Londoño 1991, Marulanda et al. 2002), thus conserve a high variability of the species, which is convenient topic of study in order to continue conserving *G. angustifolia* using this strategy.

Molecular markers are tools that have allowed to estimate the genetic variability in many species, characterize varieties in germplasm banks, select cultivars, estimated population dynamics and to carry out taxonomic, ecological and evolutionary studies in diverse organisms (Parker et al. 1998, Bachmann 1994, Chasan 1991). In order to obtain basic knowledge for the development of conservation strategies, it is useful to implement them in *G. angustifolia*.

Microsatellites are short DNA sequences of no more than six bases repeated in tandem (Goldstein & Schlötterer 1999), have codominant inheritance, are neutral and highly polymorphic, thus allowing each individual genotype and conduct allocation of parental (Parker et al. 1998, Chambers & MacAvoy 2000), characteristics that facilitate to conduct specific ecological, evolutionary and taxonomy studies, such as estimating the effective size, genetic diversity and structure of populations, allowing to characterize varieties or cultivars identification and selection, identification of breeding systems, gene flow, migration and introgression (Ouborg et al. 1999; Frankhan et al. 2002, Chambers & MacAvoy 2000, Barrera 1996). The use of these molecular markers has not yet been reported for any species of the genus *Guadua*, so its implementation is relevant.

In this study, the polymorphic information content of 26 microsatellite systems was evaluated in 46 accessions of *G. angustifolia* from the Germplasm Bank of Bambusoideae. Then will be useful in population analysis, and in taxonomic and micro evolutionary studies, knowledge that will help in the creation and implementation of strategies for conservation and sustainable use of *Guadua*.

## Methodology

The study was conducted at the Laboratory of Molecular Biology of the Alexander Von Humboldt (IAvH) Institute located in the facilities of the International Center for tropical Agriculture (CIAT).

### *The Germ Bank and Sampling*

The Germplasm Bank of Bambusoideae is located in the district of Mateguadua, Municipality of Tulua (Valle del Cauca), approximately 800 meters away from the administrative headquarters of the Botanical Garden Juan Maria Cespedes owned by the INCTVA. It has an area of about 2 500 m<sup>2</sup>. It has climatic conditions characteristic of tropical dry forest with an altitudinal location between 950 to 1 100 meters (Londoño 1990).

Young leaves were collected in good condition from 45 accessions of *G. angustifolia* from different departments of Colombia and one accession from Costa Rica, 14 accessions of different species of the genus *Bambusa*, and three of *Guadua* (Table 1). The leaf tissue was placed in paper bags that were stored immediately in plastic jars filled with silica gel with cobalt indicator. The leaves collected were finely macerated in liquid nitrogen. The mash was kept at -80 ° C until DNA extraction.

### *DNA Extration and quantification*

The DNA was extracted with the Micro extration DNA protocol of Dellaporta (1983) with modifications for rice and with a later modification for *G. angustifolia* by Potoni et al. (2006).

The evaluation of the DNA was performed by electrophoresis in horizontal agarose gels at 0.8% stained with ethidium bromide, at 48 volts for 30 minutes, adding 2 ul of DNA. It was visualized on a UV transilluminator (Fotodyne Inc). Quantification was carried out in a TECAN spectrophotometer multifunctional Genius, Austria, 260 nm and by agarose gels comparison with DNA Lambda.

### *Primer microsatellite design*

DNA from one individual was used as a source of genomic clones and was used to prepare and enrich GATA tetranucleotide markers in *G. angustifolia*. Genomic DNA was used as starting material- then Pst I/Hae III double restriction/ligation to linker M28/M29p. M28 5' CTCTTGCTTGAATTCGGACTA M29p 5' pTAGTCCGAATTCAAGCAAGAGCACA). Linker-ligated DNA was denatured and hybridized to biotinylated microsatellite 5' biotin GATA6 (50C), Dynal M270 beads and amplification with M28 primer. Eco RI digestion and ligation into de-phosphorylated Eco RI treated pUC19 followed by electroporation into *E. coli* DH10B. Colony screening was used 5' 32P- GATA6 50C in 5XSSPE washes in 5XSSPE 50C. A set of 24 positive GATA clones were sequenced and 26 primer pairs were tested. Sequences were obtained by amplifying an aliquot of frozen bacterial culture from positive hybridizing 32-P GATA6 colonies using the M13 forward (F) and reverse (R) primers. The amplification reactions were treated with Exonuclease I and alkaline phosphatase to remove excess primer and unincorporated deoxynucleotide triphosphates. After heat deactivation, approximately 10 ng of PCR product was sequenced using M13 forward and/or reverse primers with Applied Biosystems Big Dye V3.1 and ABI3730 .

Table 1. Accessions studied from the Bambusoideae Germplasm Bank of the Botanical Garden Juan María Céspedes.

Accession Code	Species	Morphological Variants	Provinces
XL 375	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Cauca, Mercaderes
XL 345	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Santander, Floridablanca
XL 542	<i>Guadua superba</i>		Amazonas, Leticia
JA 1006	<i>Guadua amplexifolia</i>		Sucre
XL 343	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Santander, Puente Nacional
JA 1003	<i>Guadua amplexifolia</i>		Córdoba, Montería
Bicolor 43	<i>Guadua angustifolia</i>	Bicolor	Valle del Cauca, Tuluá
<i>Bambusa vulgaris</i>	<i>Bambusa vulgaris</i>	Bitata	
JA 1004	<i>Guadua amplexifolia</i>		Sucre, Sincelejo
<i>Bambusa vulgaris</i> (M2)	<i>Bambusa vulgaris</i>	Vulgaris	
XL 233	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Nariño, Ricaute
XL 282	<i>Guadua paniculata</i>		Meta, Serranía de Matupa
XL 124	<i>Guadua angustifolia</i>	Nigra	Valle del Cauca, Tuluá
XL 214	<i>Guadua glauca</i>		Putumayo, Mocoa
XL 281	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Meta, Acacia
XL 291	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Meta, Serranía de la Macarena
<i>Bambusa bambos</i>	<i>Bambusa bambos</i>		
XL 303	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Meta, Cumaral
JA 1026	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Huila, Aipe
<i>Guadua weberbaueri</i>	<i>Guadua weberbaueri</i>		
XL 115	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Caqueta, Belén de los Andaquíes
XL 206	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Putumayo, Puerto Caicedo
Bicolor42	<i>Guadua angustifolia</i>	Bicolor	Valle del Cauca, Tuluá
XL 109	<i>Guadua uncinata</i>		Caqueta, Morelia
XL 1012	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Antioquia, Venecia
<i>Guadua paniculata</i>	<i>Guadua paniculata</i>		
<i>Guaduaangus</i> (Costa Rica)	<i>Guadua angustifolia</i>		Costa Rica
JA 1028	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Cundinamarca, Guaduas
XL 91	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Huila, San Agustín
JA 1031	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Caldas, Florencia
XL 235	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Nariño, Ricaute
JA 1023	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, El Cairo
XL 344	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Santander, Curiti
XL 208	<i>Guadua uncinata</i>		Putumayo, Puerto Caicedo
<i>Bambusa vulgaris</i> (M1)	<i>Bambusa vulgaris</i>	Vulgaris	
JA 1042	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Risaralda, Santa Rosa

JA 1049	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, Tuluá
JA 1041	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Risaralda, Pereira
JA 1038	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Sevilla
JA 1039_2	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, Sevilla
JA 1046_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Río Frio
XL 144	<i>Guadua glauca</i>		Caqueta, Florencia
JA 1038_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Sevilla
JA 1047_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Buga
JA 1048	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Tuluá
JA 1035_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Castilla	Valle del Cauca, El Carrizo
JA 1045	<i>Guadua angustifolia</i>	Castilla	Quindío, Barcelona
JA 1040	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, B/lagrande
JA 1056	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, Cali
JA 1055	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, Jamundí
JA 1051_2	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Jamundí
JA 1052_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Jamundí
JA 1056B	<i>Guadua angustifolia</i>	Macana	Valle del Cauca, Cali
JA 1058	<i>Guadua angustifolia</i>	Castilla	Quindío, Quimbaya
JA 1057	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Quindío, La Tebaida
JA 1059_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, Alcalá
JA 1060_1	<i>Guadua angustifolia</i>	Bicolor	Valle del Cauca, Tuluá
JA 1061	<i>Guadua angustifolia</i>	Cebolla	Valle del Cauca, Restrepo
JA 1062_2	<i>Guadua angustifolia</i>	Bicolor	Valle del Cauca, Vijes
JA 1063	<i>Guadua angustifolia</i>	Cotada	Valle del Cauca, Restrepo
JA 1064	<i>Guadua angustifolia</i>	Bicolor	Valle del Cauca, Buga

JA= J. Adarve; XL= X. Londoño; nr= whitout number

### Amplification of microsatellite regions

Initially, 26 microsatellites designed were tested for *G. angustifolia* by PCR in the accessions of this species. They were subsequently tested in other species of *Bambusa* and *Guadua* genus. Each reaction mixture contained 35ng/ul DNA, 10 mM Tris pH 9, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM of each dNTP, 0.072μM of each primer and 3U Taq polymerase (CIAT Biotechnology Unit) to a final volume of reaction 25 μl. We used a thermal cycler PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, following the program: 94 ° C for 1 minute (94 ° C for 30 seconds, 54 ° C for 45 seconds, 72 ° C for 45 seconds) 35 times, 72 per 10 minutes, 4 ° C for five minutes, with temperature-specific banding of *G. angustifolia* optimized for each locus, which works for the other species of the genus *Bambusa* and *Guadua* (Table 2). The reaction product was assessed on agarose gels 1.5%, stained with ethidium bromide, loading 8 μl of the product together with 2 ml of buffer blue juice.

The identification of each allele per locus was performed by electrophoresis in vertical polyacrylamide gels prepared in 4% TBE 0.5X. A PCR product was added a solution of formamide (0.05% Bromophenol blue and xilencianol, in 95% formamide, 20 mM EDTA) in a 1 ml of solution per 5 ml of PCR product is denatured and a 94 ° C for 5 minutes before serving. The amount of product added to the gel varied with their concentration. The electrophoretic separation was performed at 120W, with an initial flow of 1,800 to 2,000 V with an optimum temperature of 50 ° C. Separation After about an hour apart, the gel was fixed, dyed with silver nitrate and revealed according to the method of Bassam et al. (1991). The reading of each gel was conducted on a white light transilluminator, counting the bands with higher resolution.

### Data analysis

From the profiles obtained in the polyacrylamide gels, alleles of each locus were visually based on their molecular size (bp) using as reference the known values of the markers 10bp and 25 bp (Invitrogen Corp., Carlsbad, California ). Later, the genotypes were described by generating a matrix of presence / absence (binary) of alleles for each microsatellite. It was counted the number of alleles identified per locus (A) and their frequencies were estimated using the respective SunOS 5.9 platform SAS version 9.1.3. At each locus, we calculated the allelic richness (A-1), the homocigosity (ho) and heterozygosity (He) observed, the unbiased expected heterozygosity of Nei (1978),  $H_e = n(1 - \sum p_i^2) / n - 1$ , the polymorphic information index (PIC)

according to Botstein et al.(1980),  $PIC = 1 - (\sum p_i^2) - \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n 2p_i^2 p_j^2$  where,  $p_i$  was the frequency of the i

allele and  $p_j$  is the frequency of the j allele. The probability of identity (I) defined as the ability of two individuals at random from the population within a given locus have the same genotype by locus (Paetkau et al.

1995) was estimated as  $I = \sum p_i^4 + \sum_{i=1}^{n-1} \sum_{j=i+1}^n (2p_i p_j)^2$  and the combined probability of identity (Ic) as

$I_c = \prod I_k$ , where k represents the locus, and indicates, for all microsatellite used, if are good descriptors of the diversity in the germplasm bank.

**Table 2.**Standardized microsatellites in different species of *Guadua* and *Bambusa* genus with temperature of annealing of *G. angustifolia*

Locus	T. annealing in <i>G. angustifolia</i> (°C)	Size (Pb) in <i>G. angustifolia</i>
Bam 1- 14	54	230
Bam 1- 15	54	180
Bam 11- 2	54	120
Bam 1-11	54	280
Bam 1-17	54	250
Bam 1-22	54	280
Bam 1-3	54	150
Bam 1-5	54	180
Bam 1-6	54	250
Bam 16-2	54	200
Bam 17- 2	54	250
Bam 1-8	54	250
Bam 2-1	50	250
Bam 2-11	54	150
Bam 2-13	54	250
Bam 2-2	54	500
Bam 2-3	48	180
Bam 2-5	48	250
Bam 2-6	50	180
Bam 2-7	54	500
Bam 2-8	45	200
Bam 4-2	54	250
Bam 9-2	54	180

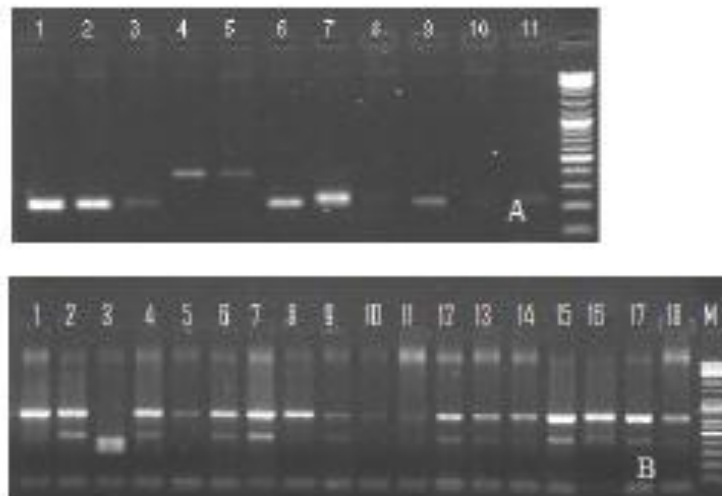
Note: The sequences of the primers (5'-3') and type of repetition is not included in this table because they have not yet been published and are the property of the entities funding the project.

## Results and Discussion

### *Amplification of the microsatellites regions*

Of the 26 microsatellites evaluated were able to standardize in *G. angustifolia* 10 loci in *G. superba*, *G. amplexifolia* and *G. weberbaueri* 7 loci, in *G. paniculata*, *G. glauca* and *G. uncinata* 8 loci, in *B. vulgaris* 18 loci and in *B. Bambas* 12 loci (Table 3).

The amplification in agarose gels ranged between 150 and 500 bp and in the acrylamide gels were distinguished alleles between 101 and 500 bp (Figures 1 and 2).



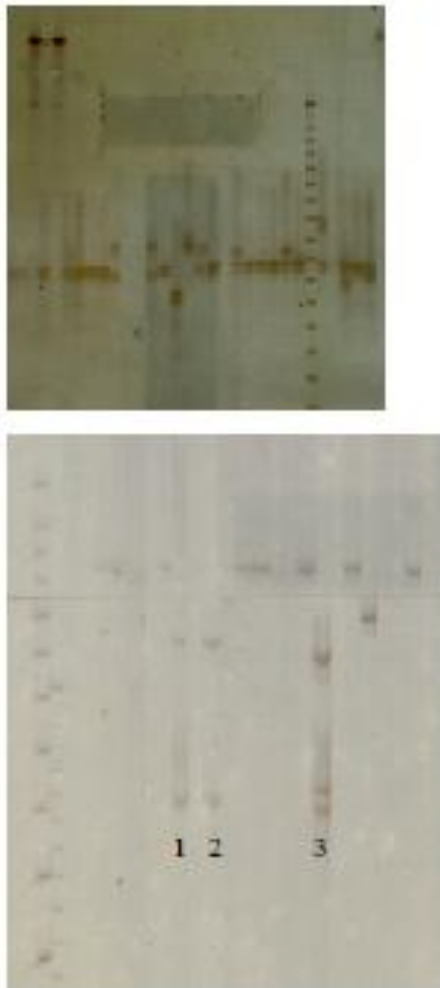
**Figure 1. Microsatellites Amplification. A. Amplification of locus Bam 2-13 in *G. angustifolia* (1-3, 6-11) and *B. vulgaris* (4, 5). B. Bam 1-11 in *G. angustifolia* (1-18) and *B. vulgaris* (3).**

**Table 3. Optimally standardized microsatellites in each species of *Bambusa* and *Guadua* genus.**

Especies	<i>G.</i> <i>angustifolia</i>	<i>G.</i> <i>superba</i>	<i>G.</i> <i>amplexifolia</i>	<i>G.</i> <i>paniculata</i>	<i>G.</i> <i>glauca</i>	<i>G.</i> <i>uncinata</i>	<i>G.</i> <i>weberbaueri</i>	<i>B.</i> <i>bambos</i>	<i>B.</i> <i>vulgaris</i>
Bam 2-1	X			X	X	X			
Bam 2-13	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-5	X	X	X		X	X	X		
Bam 2-2	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-3	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-6	X			X					X
Bam 1-11	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-7	X	X	X	X	X	X	X		
Bam 2-11	X	X	X	X	X	X	X	X	X
Bam 2-8	X								
Bam 1-14									X
Bam 1-15								X	X
Bam 11-2									X
Bam 1-17								X	X
Bam 1-22								X	X
Bam 1-3									X
Bam 1-5									X
Bam 1-6								X	X
Bam 16-2									X
Bam 17-2								X	X
Bam 1-8								X	X
Total	10	7	7	8	8	8	7	12	18



The amplification of microsatellite regions in species of the same genus has been reported in plants such as cassava (Roa et al. 2000), in forest trees (Dayananda et al. 1997), and apparently is very common in the grasses. Indeed, within the subfamily Bambusoideae, Nayak & Rout (2005) also succeeded in amplifying 18 microsatellite regions in different species of the genus *Bambusa*. Marulanda et al. (2007) tested Single Sequences Repeats (SSR) in rice and sugarcane in different species of the *Guadua* genus, obtaining successful amplification of 37 of these sequences, which indicates the great genetic proximity between the genus in this family, as reported Ishii & McCouch (2000), Kresovich et al. (1995) and Zhao & Kochert (1992), who have identified sequences of rice capable of amplifying in different species of maize and bamboo.



**Figure 2.** Viewing acrylamide gels at 4% for the identification of alleles of the loci A. Bam 2-13 and B. Bam 2-11 (*Bambusa*: 1, 2, 3)

This high conservation of microsatellite loci within the family Poaceae promotes the study of genetic variability in species where these markers have not been developed yet, since it would be possible to use these SSR sequences that have been evaluated, such as those obtained in this study, instead of making the whole process of design libraries, saving time and money. In turn, this would permit obtaining the knowledge of the genetic diversity in those species for which this area is unknown, as in the case of most bamboos. As a result, it is recommended to evaluate this new set of microsatellites in other species of the subfamily Bambusoideae.

Regarding the loci Bam 2-8 and Bam 2-11, although amplified in all species of *Guadua* and *Bambusa* they presented a profile of bands in acrylamide gels similar to those with a multilocus gene origin (Avice 1994). However, only the locus Bam 2-11 were achieved analyzable, consistent, and reproducible, bands in all the accessions studied (Figure 3). Nevertheless, it is recommended a further analysis of its primers design.



Figure 3. Perfil de bandas obtenidas con el locus Bam 2-11 en geles de acrilamida al 4%.

### Evaluation of microsatellites

With the eight loci amplified in 46 accessions of *G. angustifolia*, 69 alleles were found in total, with an average of  $8625 \pm 3662$  alleles per locus, ranging between 5 and 14 alleles and allelic richness averaged  $7625 \pm 3662$  (Table 4). Three null alleles were obtained in the loci Bam 2-6, Bam 2-2 and Bam 2-7, one in each locus, respectively. With the Bam 2-11 locus, profiles were obtained in acrylamide from 5 to 9 bands per individual, with 20 alleles in the 46 accessions of *G. angustifolia*. On average, there were more heterozygotes than homozygotes in the eight loci. In the locus Bam 1-11, heterozygous individuals are not distinguished, while in the locus Bam 2-1, the majorities were it (Table 4).

The polymorphic information content (PIC) has been widely used as a descriptor of the degree of information that provides a site of the genome. PIC values above 0.5 indicate highly polymorphic loci, such as the loci 2-1 Bam, Bam 2-5, Bam 2-7, Bam 2-6 and Bam 1-11; informational medium values between those with 0.25 and 0.5, as were the loci Bam 2-13, Bam 2-2 and Bam 2-3 and informative little lower than the value 0.25. According to this descriptor, no loci were monomorphic for the 46 accessions of *G. angustifolia* and the most informative locus was Bam 2-6 with a PIC value of 0.8517 (Figure 4). However, this index came from studies in human genetics and the purpose of assessing the likelihood of being able to deduct from the genotype of an offspring, of which their parents had received a particular feature. Because of this, when wild populations are being studied in the absence or individuals without knowing their parents, this index is not the most desirable, also implies the absence of recombination.

Table 4. Descriptive estimators of genetic diversity obtained for 8 microsatellite systems evaluated in the accessions of *G. angustifolia*.

Locus	T annealing	High- Frequency alleles		PIC value	Probability	A	A-1	ho	Ho	he	He
		Allele (bp)	Frequency								
Bam 2-1	50	232	0.2283±0.0619	0.8511	0.1082	14	13	0.0435	0.9565	0.1349	0.8843
Bam 2-13	54	228	0.7609±0.0629	0.3981	0.4134	11	10	0.5870	0.4130	0.5896	0.4196
Bam 2-5	48	254	0.2174±0.0608	0.6750	0.1269	13	12	0.4130	0.5870	0.2966	0.7191
Bam 2-2	54	500	0.6848±0.0685	0.4672	0.2871	5	4	0.6957	0.3043	0.5017	0.5094
Bam 2-3	48	166	0.7609±0.0629	0.3860	0.3730	6	5	0.6304	0.3696	0.5951	0.4139
Bam 2-6	50	152	0.1196±0.0478	0.8517	0.0334	9	8	0.8696	0.1304	0.1385	0.8807
Bam 1-11	54	437	0.6304±0.0712	0.5043	0.2480	6	5	10,000	0.0000	0.4518	0.5604
Bam 2-7	54	429	0.3913±0.0720	0.6294	0.1566	5	4	0.6522	0.3478	0.3103	0.7051
Total						69	61				
Average						8.625±3.662	7.625±3.662	0.611±0.290	0.389±0.290	0.377±0.185	0.6356±0.1894

Number of alleles per locus (A), allelic richness (A-1); observed homocigosity (ho), observed heterozygosity (Ho); expected homocigosity (I) Nei unbiased heterozygosity (He), polymorphic information content (PIC); probability of identity (I).

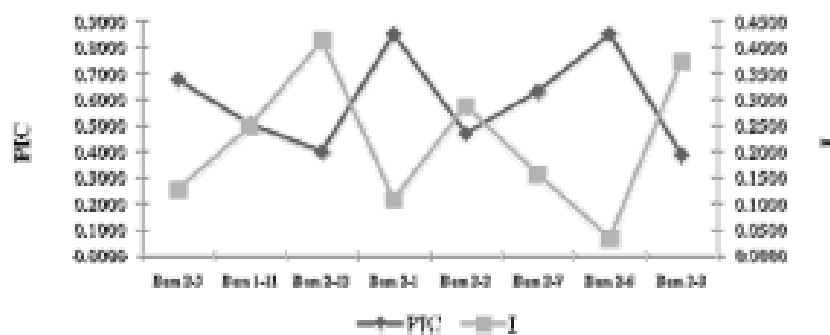


Figure 4. Comparison of the polymorphic information content (PIC) and probability of identity (I) obtained with eight loci in 46 accessions of *G. angustifolia*

The probability of identity (I) may be a better estimate of the degree of information of the genome of a site obtained by the SSR in populations, because it indicates how high is the probability of finding two individuals at random in the same locus in particular, and therefore that is so discriminating that site. Furthermore, it is not based on any postulate, but rather more a probability. Among lower the values of I are the most informative sites studied using microsatellites. According to this index, the locus Bam 2-6 is the most informative (0.0334), followed by Bam 2-1 (0.1082), and the least informative loci is Bam 2-13 (0.4134) (Figure 10). In turn, the combined probability of identity, evaluate how good is the set of all microsatellites for the diversity analysis, in this case, I<sub>c</sub> was  $7.882 \times 10^{-67}$ , indicating that the eight loci analyzed for 46 accessions *G. angustifolia* are sufficiently informative to study the genetic diversity in this bank.

## Acknowledgments

The Institute for Research and Preservation of Cultural and Natural Heritage of Valle del Cauca, INCIVA, to The University Santiago de Cali and the Center for Research in Basic Sciences, Environmental and Technological Development of the Universidad Santiago de Cali (CICB), by funding this research. The Laboratory of Molecular Biology and Tissue Collection of the Research Institute of Biological Resources Alexander Von Humboldt LAVH-by funding and technical support during the investigation. A Miryam Cristina Duque for his selfless assistance in conducting statistical analysis and interpretation of them and Dora Jhoana Rios for his help in the standardization and analysis of microsatellites.

## References

- Avise, J.C. 1994. Molecular markers, natural history & evolution. New York, Chapman & Hall. 511p.
- Bachmann, K. 1994. Tansley Review No. 63: molecular markers in plant ecology. *New Phytologist*, 126 (3): 403-418.
- Barrera, E. 1996. Obtención de frecuencias microsatélites en frijol (*Genaro Phaseolus*). Tesis de pregrado. Cali-Colombia, Universidad del Valle, Facultad de Ciencias. 103p.
- Bassam, B.J.; Caetano. G & Gresshoff, P.M.. 1991. Fast and sensitive silver staining of dna in polyacrilamide gels. *Analytical Biochemistry* 190: 80-83.
- Botstein, D.; White R.L.; Skolnick, M and Davis R.W. 1980. Construction of a genetic linkage map in man using restriction fragment length polymorphisms. *Am. J. Hum. Genet.* 32:314-331.
- Bystrakova, N; Kapos, V; Stapleton, C. & Lysenko, I. 2003. Bambu Biodiversity. UNEP-WCMC/TNBAR.
- Bystrakova, N; Kapos, V & Lysenko, I. 2004. Bambu Biodiversity. UNEP-WCMC/TNBAR.
- Castañó, F & Moreno R. D. 2004. Guadua para todos, cultivo y aprovechamiento. Bogotá, Panamericana Formas e Impresos S.A. 187p.
- Chambers, G. K. & Macavoy, E.S. 2000. Microsatellites: consensus and controversy. *Comparative Biochemistry and Physiology* 126: 455-476.
- Chasan, R. 1991. Molecular biology and ecology: a marriage of more than convenience. *The Plant Cell*, 3 (11):1143-1145.
- Cruz, I. A. 1994. La Guadua: Nuestro Bambu. Armenia, Fudegraf. 293p
- Dayanandan, S. K; Bawa, S & Kesseli, R. 1997. Conservation of Microsatellites Among Tropical Trees (*Leguminosae*). *American Journal of Botany* 84 (12):1658-1663
- Frankham, R; Ballou, J.D. & Briscoe, D.A. 2002. Introduction to Conservation Genetics. United Kingdom, Cambridge University Press. 617p
- Goldstein, D.B & Schlotterer, C. 1999. Microsatellites: evolution and applications. Oxford University Press, New York. 350p.
- Ishii, T & McCouch, S.R. 2000. Microsatellites and microsynteny in the chloroplast genomes of *Oryza* and eight other Gramineae species. *Theor Appl Genet* 100:1257-1266.
- Kresovich, S; Szewc-McFadden, A.K; Blick, S & McFerson, J.R. 1995. Abundance and characterization of simple sequence repeats (SSRs) isolated from a size-fractionated genomic library of *Brassica napus* L. (rapeseed). *Theor. Appl. Genet.* 91:206-211.
- Londoño, X. 1990. Aspectos sobre la distribución y la ecología de los bambúes de Colombia (*Poaceae: Bambusoideae*). *Caldasia* 16 (77): 139-153.
- Londoño, X. 1991. Estudio botánico, ecológico, silvicultural y económico-industrial de las Bambusoideae de Colombia. *Cespedesia* 16-17(59):51-78.
- Marulanda, M.L; Márquez, P & Londoño, X. 2002. AFLP analysis of *Guadua angustifolia* (*Poaceae: Bambusoideae*) in Colombia with emphasis on the Coffee Region. *The Journal of the American Bamboo Society* 16(1): 32-42.
- Marulanda, M. L; López, A. M. & Clarez, J.L. 2007. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp. in Colombia using rice and sugarcane microsatellites. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 43-51.
- Mcneely, J.A. 1995. Bambu, biodiversity and conservation in Asia en: PROCEEDINGS OF THE VTH INTERNATIONAL BAMBU WORKSHOP AND THE IV INTERNATIONAL BAMBU CONGRESS. 19 - 22 junio 1995. Ubud, Bali, Indonesia. International Network for Bambu and Rattan, Environmental Bambu Foundation, International Plant Genetic Resources Institute, International Development Research Centre. Vol. 2: 23-44



- Nayak, S & Rout, R. 2005. Isolation and characterization of microsatellites in *Bambusa arundinacea* and cross species amplification in other bamboos. *Plant Breeding* 124: 599-602.
- Nei, M. 1978. Estimation of average heterozygosity and genetic distance from a small number of individuals. *Genetics* 89: 583-590.
- Ouborg, N.J; Piquot, Y & Van Groenendaal, J. M. 1999. Population Genetics, Molecular Markers and the Study of Dispersal in Plants. *The Journal of Ecology*, 87(4): 551-568.
- Parker, P.G; Snow, A.A; Schug, M.D; Booton, G.C & Fuerst, P.A. 1998. What molecules can tell us about populations: choosing and using a molecular marker. *Ecology*, 79 (2): 361-382.
- Potost, C. T; Vallejo, F. A & Palacio-Mejía, J. D. 2006. Estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en *guadua* en el departamento del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica* 55(2): 43-47.
- Paedkan, D & Strobeck, C. 1994. Microsatellite analysis of genetic variation in black bear populations. *Molecular Ecology* 3:489-495.
- Roa, A. C; Chavarriaga-Aguirre, P; Duque, M. C; Maya, M. M; Bonierbale, M. W; Iglesias, C & Tohme, J. 2000. Cross-Species Amplification of Cassava (*Manihot esculenta*) (Euphorbiaceae) Microsatellites: Allelic Polymorphism and Degree of Relationship. *American Journal of Botany*, 87(11):1647-1655.
- Stapleton, C.M.V & Ramanatha RAO, V. 1995. Progress and Prospects in Genetic Diversity. *Studies on Bambu and its conservation* [on: PROCEEDINGS OF THE VTH INTERNATIONAL BAMBÚ WORKSHOP AND THE IV INTERNATIONAL BAMBÚ CONGRESS](#). 19 – 22 junio 1995. Ubud, Bali, Indonesia. International Network for Bambu and Rattan, Environmental Bambu Foundation, International Plant Genetic Resources Institute, International Development Research Centre. Vol. 2: 23-44
- Villegas, M; Villegas, B; Villegas, L & Londoño, X. 2003. *Guadua: arquitectura y diseño*. Colombia, Villegas editores. 208p.
- Young, S.M. & Judd, W. S. 1992. Systematics of the *Guadua angustifolia* Complex (Poaceae: Bambucoideae). *Annals of the Missouri Botanical Garden*, 79 (4): 737-769.
- Zhao, X & Kochert, G. 1992. [Characterization and genetic mapping of a short, highly repeated, interspersed DNA sequence from rice \(\*Oryza sativa\* L.\)](#). *Molecular & general genetics* 231(3):353-9.

**Caracterización Molecular Mediante Marcadores Microsatélites de las Accesiones de *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) del Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes de Tuluá- Valle del Cauca**

by Lorena Torres, Diana Carolina López, Juan Diego Palacio-Mejía, Myriam C Duque, Carlos Andrés Pérez Galindo, Iván Andrés González Vargas, Heiber Cárdenas-Henao

Biological Sciences › Agricultural Science Papers

V Congreso Colombiano de Botánica (2009)





rev. asoc.  
col. cienc.  
biol.

Popayán, Cauca  
(Colombia)

No. 21,  
suplemento 1

p.p. 1-354

2009

ISSN  
0120-4173.



Ingrid J Méndez Ricardo<sup>1</sup> & Juan M. Díaz Soto<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Departamento de Biología. Laboratório de Biotecnología vegetal. Diagnostico fitosanitario.

Grupo de investigación en Biotecnología vegetal (BIOVUS).

Universidad de Sucre.

La yuca es uno de los cultivos más importantes para Colombia, destacándose la Costa Atlántica por su alta producción. Sin embargo, es susceptible al ataque bacteriano, lo que es una amenaza crítica puesto que son agentes causales de infecciones sintomáticas y asintomáticas en tejidos vegetales. Entre las bacterias asociadas a daños en el cultivo de yuca, encontramos a *Pectobacterium carotovorum* ssp *carotovorum* (*Erwinia carotovora* ssp *carotovora*) que ocasiona "pudrición blanda", causando marchitez en los cogollos de la planta y necrosis del tallo, seguida por muerte descendente y formación de canchales en tallos. Se realizó un procedimiento para el diagnóstico de este patógeno utilizando técnicas microbiológicas y moleculares. Se logró aislar una bacteria de color blanco y aspecto opaco que resultó negativo para tinción de gram, catalasa positiva y oxidasa negativa, fermentó glucosa y lactosa con ruptura del medio y producción de H<sub>2</sub>S en la prueba de kligler. Presentó forma de bacilos cortos lo que permitió ubicarla en el género *Erwinia* que dio positivo en el ensayo inmunológico para la especie *Pectobacterium carotovorum* mediante la técnica de Inmunoblot (Kit de Agdia). Estos resultados fueron corroborados con pruebas de patogenicidad, los cuales mostraron necrosis en el punto de inoculación a los 7 días y marchitez total a los 30 días. Mediante PCR con los iniciadores G1 y L1, dio origen a productos de amplificación de 535 bp y 575 bp correspondientes para la subespecie *Pectobacterium carotovorum* ssp *wasabi*.

**Palabras claves:** *Pectobacterium carotovorum* ssp *Pectobacterium carotovora* ssp *wasabi*, *Erwinia*, *Manihot esculenta* Crantz, PCR, pudrición blanda, inmunoblot. Patogenicidad.

**GB 47. EVALUACIÓN DEL POLIMORFISMO DE MARCADORES MICROSATÉLITES EN *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) PARA LA CARACTERIZACIÓN MOLECULAR DE LAS ACCESIONES DEL BANCO DE GERMOPLASMA DE BAMBUSOIDEAE DEL JARDÍN BOTÁNICO JUAN MARÍA CÉSPEDES DE TULUA- VALLE DEL CAUCA.**

Lorena Torres<sup>1</sup>, Carlos Andrés Pérez Galindo<sup>1</sup>, Diana Carolina Lopez<sup>2</sup>, Iván Andrés González Vargas<sup>1</sup> & Heiber Cárdenas Henao<sup>1</sup>.

<sup>1</sup> Universidad Santiago de Cali, Grupo de Investigación en Biotecnología y Medio Ambiente

(GIBMA). <sup>2</sup> Laboratorio de Biología Molecular Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt.

El Banco de Germoplasma de Bambusoideae en el Jardín Botánico Juan María Céspedes, propiedad del INCIVA (1987), cuenta con accesiones de *G. angustifolia* provenientes de 16 departamentos de Colombia, conservando una gran variabilidad fenotípica de la especie. Por lo tanto, es conveniente evaluar qué tanta variabilidad genética. En este trabajo se estudio la variabilidad molecular de *G. angustifolia* haciendo la evaluación del contenido informativo polimórfico de 25 sistemas microsátélites en 46 accesiones de *G. angustifolia*.

Se obtuvo amplificación de 10 loci, dos mostraron un patrón de bandas con origen génico multilocus; además, se reportó la amplificación de 14 en *Bambusa* y entre siete u ocho loci en otras especies del género *Guadua*. Los ocho loci amplificados en *G. angustifolia* presentaron valores de PIC (Polymorphism Index Content) entre 0.3981 y 0.8517 y probabilidades de identidad entre 0.0334 y 0.4134 siendo mediana y altamente polimórficos. Tomando como referencia cada una de las accesiones, no se detectó ningún patrón de agrupamiento significativo mediante los análisis de similitud y de correspondencia múltiple. La caracterización morfológica de los biotipos de *G. angustifolia* establecida anteriormente en el Banco de Germoplasma no se relaciono con la variación genética molecular, pero si se distinguieron variaciones intraespecíficas relacionadas con áreas geográficamente distantes. En los departamentos de Santander, Putumayo y Caquetá, las accesiones parecen tener un acervo génico diferente al de la región cafetera y del Valle del Cauca, por lo que se aconseja coleccionar individuos de estas zonas y al mismo tiempo plantear y orientar estrategias de conservación de *G. angustifolia* en ellas.

**Palabras Claves:** Polimorfismo, microsátélites, *Guadua angustifolia*, conservación.

**GB 48. INFLUENCIA DE LA ADICIÓN DEL EXTRACTO DE *Cannabis sativa* SOBRE EL CRECIMIENTO Y PRODUCCIÓN DE CAROTENOIDES EN CULTIVO DE *Dunaliella salina* (Teodoresco, 1995).**

Marisella Balamba<sup>1</sup>, Carmiña Vargas Zapata<sup>2</sup> & Edgardo Leal Fernández<sup>3</sup>.

<sup>1</sup> Estudiante de Biología <sup>2</sup> Docente. Coordinación de Ciencias Biológicas, Facultad de Ciencias Básicas. <sup>3</sup> Acuabios S.A. Grupo de Investigación Biología de Nutrientes. Universidad del Atlántico, Barranquilla

*Dunaliella salina* es una microalga fotosintética





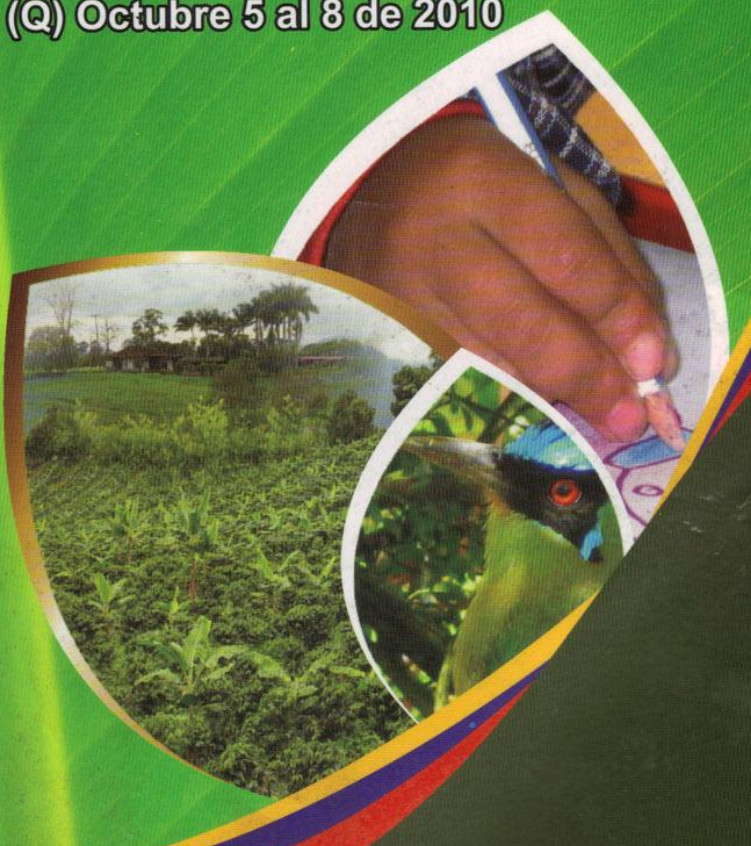
REVISTA  
DE LA  
ASOCIACIÓN  
COLOMBIANA  
DE CIENCIAS  
BIOLÓGICAS

## MEMORIAS

XLV CONGRESO NACIONAL DE CIENCIAS BIOLÓGICAS  
Armenia (Q) Octubre 5 al 8 de 2010



UNIVERSIDAD  
DEL QUINDÍO



rev. asoc.  
col. cienc.  
biol.

Armenia, Q  
(Colombia)

Número  
22  
suplemento 1

p.p. 1-235

2010

ISSN  
0120-4173



que ejercen presión sobre la microcuenca ocasionando disturbios en la dinámica natural suelo-vegetación que se manifiestan en impactos como pérdida de fertilidad y de la cobertura protectora, disminución en la calidad del agua, pérdida de hábitats y disminución en la productividad neta. Estos resultados han sido considerados para las actividades de manejo del recurso hídrico en la zona.

**Palabras clave:** calidad del agua, antrópico, evaluación de impacto ambiental.

#### ESTABLECIMIENTO DE SUSPENSIONES CELULARES de Ñame (*Dioscorea rotundata*, cv "Espino-059")

Vergara Eliab<sup>1</sup>, Castillo Luis<sup>1</sup>, Torres María<sup>1</sup>, Eduardo Hernandez, Javier Beltrán.

Laboratorio de Biotecnología Vegetal, Universidad de Sucre, E-mail: eliabverflo26@hotmail.com

Se establecieron suspensiones celulares en *Dioscorea alata*, a partir de callos cultivados en medio semisólido. Se evaluaron dos reguladores de crecimiento: 2,4D y Picloram, en cinco concentraciones (0.0, 0.1, 0.3, 1.0, y 3.0 mg/L). Utilizando para el establecimiento de las suspensiones callos friables de buena textura y una conformación que permitiera una mejor separación de sus células. Con el objeto de analizar el efecto de la densidad celular sobre el crecimiento celular, se cuantificó la tasa de crecimiento, en base a la producción de biomasa fresca, y biomasa seca. El mejor rendimiento en la producción de biomasa (callo) se observó en el tratamiento con 0.3 mg/L de 2,4D. La regeneración de plántulas, por vía directa y/o indirecta se observó en el tratamiento de 1.0 mg/L de 2,4-D. Estos resultados permiten concluir, que a partir de plantas de *Dioscorea rotundata*, y bajo condiciones de laboratorio, se pueden inducir callos friables, que permiten el establecimiento de suspensiones celulares, con capacidad de regeneración de plantas o variantes somaclonales, para evaluación de su potencial morfo-agronómico.

**Palabras clave:** Callos, densidad celular, *Dioscorea* spp, reguladores de crecimiento.

#### ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN LOS RODALES NATURALES DE *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) EN EL VALLE DEL

#### CAUCA- COLOMBIA, PARA EL USO SOSTENIBLE Y CONSERVACIÓN DE SUS RECURSOS GENÉTICOS

Carlos Andrés Pérez Galindo<sup>1</sup>, Lorena Torres Martínez<sup>4</sup>, Iván Andrés González<sup>2</sup>, Juan Adarve<sup>3</sup>, Diana Carolina López<sup>4</sup> y Heiber Cárdenas Henao<sup>2</sup>

<sup>1</sup> Grupo de Investigación en Biotecnología y Medio ambiente de la Universidad Santiago de Cali. Pegaso107@gmail.com. <sup>2</sup> Universidad del Valle. <sup>3</sup> Instituto para la Investigación y Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca (INCIVA). <sup>4</sup> Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt

*Guadua angustifolia*, bambú americano, es una especie importante a nivel histórico - cultural en Colombia por su amplia utilidad en la industria de la construcción y es clave en la conservación de cuencas y humedales. Debido a su utilización y al crecimiento de los asentamientos humanos, son pocas las hectáreas naturales de *G. angustifolia* existentes en nuestro país (31.000 ha), ocasionando pérdida de información biológica especialmente en su diversidad genética, la cual se desconoce para las poblaciones naturales. Adicionalmente, su propagación con fines económicos o de reforestación, se está realizando a través de métodos asexuales. En el Valle del Cauca, los guaduales naturales han sido desplazados por los cultivos de caña, reduciéndolos sustancialmente. En este estudio se evaluó la diversidad genética de *G. angustifolia* en 22 rodales naturales del Valle del Cauca mediante el desarrollo de 8 microsatélites diseñados para la especie, obteniéndose cinco marcadores altamente polimórficos y tres en equilibrio Hardy Weinberg que incrementan la variabilidad dentro de individuos. Sin embargo, la variabilidad genética entre individuos dentro de cada localidad es muy homogénea y la variación en tres localidades fue altamente significativa, indicando que en el Valle del Cauca, los rodales presentan conformación genética diferente. Es decir, existe estructura genética significativa, lo cual insinúa que los diferentes rodales evolucionaron en ambientes muy heterogéneos. Esto es corroborado por los resultados de la AMOVA la cual muestra alta diferenciación con base en dos modelos diferentes  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , conocimiento de gran utilidad para la creación, planeación de estrategias de conservación



# ASOCIACIÓN COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLÓGICAS

Personería Jurídica 05547 - Diciembre 16 de 1974  
Nit. 805.014.676-1



## LA ASOCIACION COLOMBIANA DE CIENCIAS BIOLOGICAS CERTIFICA QUE:

1. Los trabajos de investigación presentados en extenso el Congreso Nacional y que cumplen con los requisitos estatutarios, son sometidos a evaluación por pares académicos.
2. En consecuencia y como resultado de esta evaluación el trabajo:

### **ESTIMACIÓN DE LA DIVERSIDAD GENÉTICA EN LOS RODALES NATURALES DE *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) EN EL VALLE DEL CAUCA- COLOMBIA, PARA EL USO SOSTENIBLE Y CONSERVACIÓN DE SUS RECURSOS GENÉTICOS**

Carlos Andrés Pérez Galindo, Lorena Torres Martínez, Iván Andrés González, Juan Adarve, Diana Carolina López y Heiber Cárdenas Henao

Se le otorgó el

### **PREMIO NACIONAL EN EL ÁREA GENÉTICA Y BIOTECNOLOGÍA**

En el marco del XLV Congreso Nacional de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas celebrado en la ciudad de Armenia entre el 5 y el 8 de Octubre de 2010.

Esta certificación se expide a solicitud de los interesados

  
**JESUS BALLESTEROS CORREA**  
Presidente Junta directiva Nacional

Dada en Armenia a los 8 días del mes de Octubre de 2010

ACCB

**Extenso del trabajo con el cual se obtuvo el premio nacional en Genética y Biotecnología, en el marco del XLV Congreso Nacional de la Asociación Colombiana de Ciencias Biológicas celebrado en la ciudad de Armenia (Colombia) entre el 5 y el 8 de octubre de 2010.**

**Título del trabajo: “Estimación de la diversidad genética en los rodales naturales de *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) en el Valle del Cauca- Colombia, para el uso sostenible y conservación de sus recursos genéticos”**

**Estimation of the genetic diversity in the *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) forests in the Cauca River Valley (Colombia) for their sustainable use and the preservation of their genetic resources.**

**Autores:** *Carlos Andrés Pérez Galindo*<sup>1</sup>,

*Lorena Torres Martínez*<sup>4</sup>,

*Iván Andrés González*<sup>2</sup>,

*Juan Adarve*<sup>3</sup>,

*Diana Carolina López*<sup>4</sup>

*Heiber Cárdenas Henao*<sup>2</sup>

1. Grupo de Investigación en Biotecnología y Medio ambiente de la Universidad Santiago de Cali. [Pegaso107@gmail.com](mailto:Pegaso107@gmail.com)

2. Universidad del Valle.

3. Instituto para la Investigación y Preservación del Patrimonio Cultural y Natural del Valle del Cauca (INCIVA).

4. Instituto de Investigación de Recursos Biológicos Alexander Von Humboldt

## Abstract

*Guadua angustifolia*, american bamboo, is a historically and culturally important species in Colombia due to its widespread use in the construction industry, and it is a key element in the conservation of wet lands and river basins. Because of its widespread use in growing human settlements, there remain only a few hectares of *G. angustifolia* in Colombia (31 000 Ha). This has caused the loss of its biological information, especially of its genetic diversity, unknown in its natural population. Additionally, its propagation either for economic or conservation reason is being done by asexual methods. In the Cauca River Valley, the natural bamboo forests have been displaced by sugar cane plantations, substantially reducing their numbers. In this study, the genetic diversity of *G. angustifolia* in 22 natural bamboo forests in the Cauca River Valley was evaluated through eight (8) microsatellite loci designed for the species. It was found that five were highly polymorphic, and that three of them are in Hardy Weinberg. This increases the variability in the individuals. Nevertheless, the genetic variability among individuals within the same locality is very homogenous, and the variability of three locales was highly significant, pointing to the fact that, in the Cauca River Valley, the bamboo forests have a different genetic conformation. That is, they have different genetic structure, suggesting that the distinct bamboo forests evolved in heterogeneous environments. This is corroborated by the AMOVA results which show high differentiation based on two different models  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , useful knowledge in the creation and planning of conservation and sustainable use strategies.

**Keywords:** Polimorphism, microsatellites, *Guadua angustifolia*, conservation, genetic structure, diversity.

## Resumen

*Guadua angustifolia*, bambú americano, es una especie importante a nivel histórico - cultural en Colombia por su amplia utilidad en la industria de la construcción y es clave en la conservación de cuencas y humedales. Debido a su utilización y al crecimiento de los asentamientos humanos, son pocas las hectáreas naturales de *G. angustifolia* existentes en nuestro país (31.000 ha), ocasionando pérdida de información biológica especialmente en su diversidad genética, la cual se desconoce para las poblaciones naturales. Adicionalmente, su propagación con fines económicos o de reforestación, se está realizando a través de métodos asexuales. En el Valle del Cauca, los guaduales naturales han sido desplazados por los cultivos de caña, reduciéndolos sustancialmente. En este estudio se evaluó la diversidad genética de *G. angustifolia* en 22 rodales naturales del Valle del Cauca

mediante el desarrollo de 8 microsatélites diseñados para la especie, obteniéndose cinco marcadores altamente polimórficos y tres en equilibrio Hardy Weinberg que incrementan la variabilidad dentro de individuos. Sin embargo, la variabilidad genética entre individuos dentro de cada localidad es muy homogénea y la variación en tres localidades fue altamente significativa, indicando que en el Valle del Cauca, los rodales presentan conformación genética diferente. Es decir, existe estructura genética significativa, lo cual insinúa que los diferentes rodales evolucionaron en ambientes muy heterogéneos. Esto es corroborado por los resultados de la AMOVA la cual muestra alta diferenciación con base en dos modelos diferentes  $F_{ST}$  y  $R_{ST}$ , conocimiento de gran utilidad para la creación, planeación de estrategias de conservación y uso sostenible.

**Palabras Clave:** Polimorfismo, microsatélites, *Guadua angustifolia*, conservación, estructura genética, diversidad.

## Introducción

*Guadua angustifolia* es la especie que Kunth escogió como tipo del género *Guadua*. Su epíteto específico 'angustifolia' significa en latín 'hoja angosta' y describe una de sus características morfológicas más sobresalientes (Judziewicz et al.1999). Esta ha sido de vital importancia en aspectos históricos y culturales en Colombia y Ecuador. Con ella los indígenas construyeron instrumentos, artesanías y viviendas, fue clave en los procesos de colonización en los departamentos de Caldas, Quindío, Risaralda y Valle del Cauca. Hoy en día, juega un importante papel económico, ya que de ella se extrae pulpa para papel y madera (Cruz 1994, Londoño 1991). En áreas rurales de Colombia y demás países Latinoamericanos, la guadua se emplea en cercos, corrales, diseños agropecuarios, tutores o soportes, diques y conductos de agua. A nivel artesanal y ornamental, son numerosos los usos que se le ha dado a *G. angustifolia* (Castaño & Moreno 2004, Londoño 1991). Desde el punto de vista industrial, hay una gran potencialidad de la guadua como productora de celulosa para la industria Papelera Nacional y para la elaboración de láminas y paneles de triplex, sin embargo, su aprovechamiento industrial en Colombia está aún por desarrollarse (Castaño & Moreno 2004, Cruz 1994, Londoño 1991).

En Colombia existen cerca de 51 000 Ha en *Guadua*, de las cuales, 7 986 Ha se encuentran en el Departamento de Valle del Cauca, ocupando un 15.6% del total



nacional (SISAV 2006). En escritos de la época de la colonización se comenta como el Valle del Cauca estaba completamente cubierto de guaduales, incluso se dice que los asentamientos indígenas de la región se escondían entre estos densos bosques cuando eran atacados por los españoles (Cruz 1994). Con el paso del tiempo y el establecimiento de los asentamientos humanos y sus cultivos, especialmente el de la caña de azúcar, los guaduales han sido desplazados poco a poco. En la actualidad, el Valle del Cauca cuenta con unos pocos relictos naturales que están bajo el manejo de la Corporación Autónoma Regional del Valle del Cauca (CVC) (SISAV 2006).

Hoy en día, con la implementación de la Guadua como un producto comercial, de sus cadenas productivas y el establecimiento de su cultivo bajo metodologías asexuales para su aprovechamiento (Castaño & Moreno 2004), se hace necesario el establecimiento de medidas de conservación de sus recursos genéticos silvestres, aun desconocidos (Rao & Hodgkin 2002). Es indispensable el conocimiento de la diversidad genética y de los diferentes acervos genéticos con los que cuenta *G.angustifolia* para una implementación adecuada de sistemas de selección de variedades y cultivares, y en los programas de fitomejoramiento, para así evitar en un futuro una posible erosión genética en sus cultivares, tal y como se observó en la cebada europea (Yahiaoui 2008), especie comercial en donde se han desarrollado cultivares de alto rendimiento a través de programas de selección y en donde se observó una reducción de la base genética de los cultivares actuales. Fischbeck (1992), reporta que según los registros históricos la erosión genética en la cebada pudo haber ocurrido como consecuencia del uso de un número muy limitado de variedades criollas y cultivares primitivos en los cruces durante las etapas primarias del fitomejoramiento moderno en Europa. Asimismo, el conocimiento y conservación de la diversidad genética de *G.angustifolia* es indispensable para la permanencia y evolución de la especie en estado natural (por ejemplo, para su resiliencia frente a cambios potenciales en el ambiente) (Frankhan et al. 2002, Chasan 1991, Fontdevila & Moya 1999, Hedrick & Miller 1992).

Respecto a la diversidad genética de guadua se han efectuado cuatro estudios, tres han sido desarrollados con el objetivo de evaluar la diversidad genética conservada en el Banco de Germoplasma de Bambusoideae del Jardín Botánico Juan María Céspedes, Tuluá (Marulanda et al. 2002, Marulanda et al. 2007, Pérez – Galindo et al. 2009) y sólo el estudio de Potosí et al. (2006) ha sido realizado en relictos naturales de *G.angustifolia*, aunque todos han tenido el objetivo común de evaluar la diferenciación genética entre los biotipos reportados. En los estudios de

Marulanda et al. (2002) y Marulanda et al. (2007) mediante AFLPs y sistemas microsatélites de arroz y caña de azúcar respectivamente, encontraron una diversidad genética no significativa para la *Guadua* en el eje cafetero y no lograron caracterizar molecularmente los biotipos, mientras que en el estudio de Pérez - Galindo (2009) mediante microsatélites diseñados específicamente para *G.angustifolia*, se encontró una diversidad genética significativa en las accesiones de *G.angustifolia* del Banco de Germoplasma, reportándose una correlación entre las distancias genéticas de las accesiones y las distancias geográficas de las mismas, planteando una posible diferenciación genética a nivel geográfico, sin embargo, tampoco se reportó una diferenciación genética entre los biotipos.

A diferencia de los AFLPs, los microsatélites, secuencias de no más de seis pares de bases de largo repetidas en tándem (Goldstein & Schlötterer 1999), son altamente polimórficos y de herencia codominante (Parker et al.1998, Chambers & MacAvoy 2000), por lo que son muy utilizados en la identificación y seguimiento de individuos, en estudios de asignación de parentales (Castro et al. 2006), en análisis de pedigrí, en estudios de dispersión de plantas (Ouborg et al. 1999), en sistemas de reproducción (Young & Hammock 2007), en flujo génico y migración, en introgresión, en filogeografía, diversidad genética, en el estudio de la estructura de las poblaciones (Wilson & Provan 2003) y en la caracterización de variedades o cultivares facilitando su identificación y selección (Frankhan et al. 2002, Chambers & MacAvoy 2000).

Por otra parte, en el estudio de Potosí et al. (2006) mediante RAPD, encontraron una alta diversidad genética en los relictos naturales de la cuenca Cauca, y a su vez, lograron caracterizar y diferenciar genéticamente los biotipos. Debido a los resultados contrastantes de estos estudios se hace mas enfático profundizar en esta área de la biología de *G.angustifolia* y al mismo tiempo resulta conveniente llevar a cabo la evaluación de la diversidad genética en el Valle del Cauca y como esta puede estar posiblemente correlacionada con variables eco geográficas, ya que hasta el momento se cuenta con este conocimiento en los departamentos del Cauca, Quindío, Caldas y Risaralda.

En este estudio se realizó por primera vez la estimación de la diversidad genética en los relictos naturales de *G.angustifolia* en el Valle del Cauca mediante marcadores microsatélites (SSR) diseñadas específicamente para la especie, siendo los primeros en ser reportados en el GenBank (Pérez-Galindo et al.2009). Este conocimiento permitirá un mejor establecimiento, planteamiento y ejecución de

medidas de conservación viables para *G. angustifolia*, así como la base para los programas de fitomejoramiento de la misma.

## **Materiales y Métodos**

### **Colecta del Material Vegetal**

Se colectaron hojas jóvenes y en buen estado de 92 individuos de 39 guaduales colectados a través del Valle del Cauca. De cada guadual se muestrearon en promedio tres individuos localizados a una distancia de 5 metros uno del otro. Para cada guadual se anotó la altura sobre el nivel del mar en que se encontraba. El tejido foliar fue depositado en bolsas de papel que se almacenaron inmediatamente en tarros plásticos llenos con sílica gel con indicador de cobalto, con el fin de deshidratar el tejido. Las hojas colectadas se maceraron finamente en morteros empleando nitrógeno líquido. El macerado se conservó a -80°C hasta el momento de la extracción del ADN.

### **Extracción y cuantificación del ADN**

El ADN se extrajo mediante el protocolo de micro extracción de Dellaporta (1983) con modificaciones para arroz y posteriormente, modificado para *G. angustifolia* por Potosí et al. (2006). La evaluación se realizó por electroforesis horizontal en geles de agarosa al 0.8 %, teñidos con bromuro de etidio, cargando 2ul de ADN y 2ul de buffer blue juice, a 48 voltios por 30 minutos; se visualizaron en un transiluminador de luz ultravioleta (Fotodyne Inc). La cuantificación se llevó a cabo en un espectrofotómetro multifuncional Genius TECAN, Austria, a 260 nm y en geles de agarosa mediante comparación con ADN lambda (invitrogen).

### **Amplificación de los sistemas microsatélites**

Se evaluaron 8 de los 9 microsatélites reportados por Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (2009) (Tabla 1). Cada mezcla de reacción contenía 35ng/ul de ADN, 10mM Tris pH 9, 50mM KCl, 2mM MgCl<sub>2</sub>, 0.1mM de cada dNTP, 0.072μM de cada cebador y 3U Taq polimerasa (Unidad de Biotecnología CIAT), para un volumen final de reacción de 25 μl. Se uso un termociclador PTC-100 Programmable Thermal Controller, MJ Research, Inc, siguiendo el programa: 94°C por 1 minuto (94°C por 30 segundos, 54°C por 45 segundos, 72°C por 45 segundos) 35 veces, 72 por 10 minutos, 4°C por cinco minutos.

**Tabla 1.** Código de acceso en el Genbank de los ocho loci microsatélites evaluados y reportados por Molecular Ecology Resources Primer Development Consortium (Pérez-Galindo et al.2009).

Locus No.	Motivo de repeticion	Tamaño (bp)	Temperatura de alineamiento
FJ444930	(GATA) <sub>8</sub>	250	55
FJ444929	(GATA) <sub>10</sub>	250	48
FJ444932	(CTAT) <sub>10</sub>	500	54
FJ476075	(CTAT) <sub>13</sub>	180	48
FJ444934	(GATA) <sub>16</sub>	180	50
FJ444931	(GATA) <sub>16</sub>	250	50
FJ444936	(GATA) <sub>9</sub>	200	55

## Diversidad Genética

El nivel de polimorfismo de cada locus se calculó mediante la heterocigosidad insesgada de Nei (1978) y el índice de contenido informático polimórfico (PIC) de Bostein et al. (1980)  $PIC = \frac{1}{n} \sum_{i=1}^n p_i^2$ , donde,  $p_i$ = frecuencia del alelo  $i$  y  $p_j$ = frecuencia del alelo  $j$ , mediante los programas GenAlex (Peakall & Smouse 2006) y The excel Microsatellite Tool Kit (Park 2001). Adicionalmente, para cada

locus se calculó la riqueza alélica ( $A-1$ ), la homocigosidad observada ( $h_o$ ) o número de individuos homocigotos y la heterocigosidad observada ( $H_o$ ) o número de heterocigotos.

Para evaluar el grado de diversidad genética en *G. angustifolia* se realizó una prueba de permutación empleando el algoritmo EM (Slatkin & Excoffier 1996) empleando el programa Arlequin 3.11 (Schneider et al. 2000) con un nivel de significancia de 0,05. Para probar estadísticamente el equilibrio Hardy- Weinberg en las poblaciones por locus se realizó una prueba de Ji - cuadrado mediante el programa GenAlex (Peakall & Smouse 2006).

### **Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)**

La distribución de la variación genética en los municipios de el Valle del Cauca se realizó mediante un AMOVA usando el programa Arlequin 3.11 (Schneider et al. 2000). Los índices de fijación se estimaron por localidad, mediante los modelos de evolución de SSR de alelos infinitos y de mutación por pasos ( $F_{st}$  y  $R_{st}$ , respectivamente). El valor de significancia de los estimadores fue de 0.05 y se obtuvo usando 10000 permutaciones.

### **Relaciones genéticas entre los individuos**

Con el objetivo de evaluar el comportamiento de la diversidad genética en el Valle del Cauca, sin asumir agrupamientos a priori como el establecido por los municipios, se desarrolló un análisis de las relaciones genéticas existentes entre cada uno de los individuos. Se calculó la similitud genética entre parejas de genotipos mediante el coeficiente de Nei-Li (1979). Posteriormente, con la matriz de similitud genética, se realizó un análisis de agrupamiento a través del método UPGMA (Unweighted Pair-group Method with Arithmetic Average) con el programa NTSYS-pc versión 2.02i (Rohlf, F.J. 1996). Los grupos formados se confirmaron estadísticamente empleando el método bootstrap (re-muestreando 10000 veces) con el programa WinBoot.

## Resultados

### Diversidad de los SSR

De los 8 microsatélites ensayados en los 92 individuos colectados en el Valle del Cauca, 5 SSR fueron polimórficos (Tabla 2). Los sistemas microsatélites FJ444932 y FJ444933 resultaron monomórficos, por lo que fueron excluidos del análisis poblacional. En total se obtuvieron 24 alelos y se observaron alelos nulos en dos individuos con el SSR FJ444934. El número de alelos por locus varió entre 3 y 8, con un promedio de  $4,80 \pm 2,17$ . La diversidad genética en el total de la población, medida como la heterocigosidad esperada insesgada promedio por locus fue de  $0,5319 \pm 0,185$ .

**Tabla 2.** Estimadores de la diversidad genética en cada uno de los SSR en la población global.

Locus	He	Ho	PIC	Número de alelos (A)	Riqueza alélica (A-1)
FJ4449 30	0,3436	0,4022	0,3161	4	3
FJ4449 31	0,7512	0,9022	0,7044	6	5
FJ4449 29	0,4878	0,5435	0,3726	3	2
FJ4449 34	0,7001	0,2472	0,6356	8	7
FJ4760 75	0,3766	0,4348	0,3388	3	2

Promedio **0,5319**  
**±0,185** **4,8±2,17**

He: Heterocigosidad insesgada de Nei (1978), Ho: Heterocigosidad observada, PIC: Índice de contenido informativo polimórfico (Bostein et al.1980), A: numero de alelos por locus, A-1: riqueza alélica.

Los cinco loci no fueron igualmente polimórficos en las poblaciones, para Alcalá, Palmira y Ginebra sólo el 20% de los loci fueron polimórficos y en promedio el 55,45% de loci fueron polimórficos en las poblaciones (Tabla 2).

La riqueza alélica promedio por locus dentro de las poblaciones varió de 1,2 a 3,4. Los municipios de Alcalá, Palmira y Ginebra presentaron el menor número de alelos por locus (1,2), mientras que los municipios de Tuluá y Jamundí presentaron el mayor número (2,6 y 3,4) con un total de 13 y 17 alelos encontrados en las poblaciones, respectivamente (Tabla 3). En Jamundí y el Toro se identificaron 4 y 1 alelos privados en los loci FJ444934 y FJ444929, respectivamente. La diversidad genética, medida en términos del promedio de las heterocigosidades esperada (He) y observada (Ho), tuvo valores de 0,348 y 0,455, respectivamente. En la tabla 3 se muestran los valores obtenidos de la heterocigosidad esperada y observada dentro de cada uno de los municipios asumidos como poblaciones. En la mayoría de los casos, excepto en El Toro, Candelaria y Sevilla, la heterocigosidad esperada fue menor que la heterocigosidad observada.

Estos datos son consistentes con la prueba de precisión de cadenas de Markov, el cual reveló desviaciones significativas del equilibrio Hardy-Weinberg en la mayoría de las poblaciones (tabla 4).

**Tabla 3.** Estimadores de la diversidad genética en cada una de las poblaciones.

Población	Ho	± SD	He	± SD	%P	A	A/L	± SD
Tuluá	0,6725	±0,056 5	0,5288	±0,057 9	1,000	13,000	2,6000	±0,894 4
Yotoco	0,6000	±0,109 5	0,3429	±0,140 0	0,600	8,000	1,6000	±0,547 7
Darién	0,6000	±0,073 0	0,3176	±0,129 7	0,600	8,000	1,6000	±0,547 7

Restrepo	0,5200	$\pm 0,099$ 9	0,3156	$\pm 0,129$ 8	0,600	8,000	1,6000	$\pm 0,547$ 7
Puente Tierra	0,4000	$\pm 0,126$ 5	0,2400	$\pm 0,147$ 0	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,547$ 7
Guacarí	0,6000	$\pm 0,082$ 8	0,3231	$\pm 0,131$ 9	0,600	8,000	1,6000	$\pm 0,547$ 7
Ginebra	0,2000	$\pm 0,103$ 3	0,1200	$\pm 0,120$ 0	0,200	6,000	1,2000	$\pm 0,447$ 2
Versalles	0,4000	$\pm 0,098$ 0	0,2222	$\pm 0,136$ 1	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,547$ 7
Anserma Nuevo	0,4000	$\pm 0,082$ 8	0,3297	$\pm 0,121$ 7	0,800	10,000	2,0000	$\pm 0,707$ 1
Toro	0,4000	$\pm 0,154$ 9	0,4667	$\pm 0,192$ 9	0,600	10,000	2,0000	$\pm 1,000$ 0
Candelaria	0,2000	$\pm 0,126$ 5	0,3333	$\pm 0,210$ 8	0,400	9,000	1,8000	$\pm 1,303$ 8
Palmira	0,2000	$\pm 0,126$ 5	0,1333	$\pm 0,133$ 3	0,200	6,000	1,2000	$\pm 0,447$ 2
Vijes	0,6000	$\pm 0,154$ 9	0,4333	$\pm 0,179$ 5	0,600	8,000	1,8000	$\pm 0,836$ 7
El cerrito	0,7333	$\pm 0,118$ 2	0,5200	$\pm 0,135$ 6	0,800	10,000	2,2000	$\pm 0,836$ 7
Jamundí	0,5667	$\pm 0,090$ 5	0,5606	$\pm 0,159$ 7	0,800	17,000	3,4000	$\pm 2,408$ 3
Sevilla	0,2333	$\pm 0,078$ 5	0,2681	$\pm 0,152$ 4	0,600	11,000	2,2000	$\pm 1,643$ 2
Alcalá	0,2000	$\pm 0,126$ 5	0,1333	$\pm 0,133$ 3	0,200	6,000	1,2000	$\pm 0,447$ 2
Rio Frio	0,7000	$\pm 0,102$ 5	0,5000	$\pm 0,127$ 3	0,800	11,000	2,2000	$\pm 0,836$ 7



El Cairo	0,4000	$\pm 0,219$ 1	0,4000	$\pm 0,244$ 9	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,547$ 7
Buga	0,6000	$\pm 0,154$ 9	0,5000	$\pm 0,139$ 4	0,800	10,000	2,0000	$\pm 0,707$ 1
Buga Lagrande	0,4000	$\pm 0,219$ 1	0,4000	$\pm 0,244$ 9	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,547$ 7
Cali	0,4000	$\pm 0,154$ 9	0,2667	$\pm 0,163$ 3	0,400	7,000	1,4000	$\pm 0,547$ 7
Media	0,4557	$\pm 0,120$ 9	0,3480	$\pm 0,151$ 4	0,5545	8,8182	1,7818	$\pm 0,793$ 0

He: Heterocigosidad insesgada de Nei (1978), Ho: Heterocigosidad observada, %P: porcentaje de loci polimórficos, A: número de alelos por locus, A/L: número de alelos por locus.

## Equilibrio Hardy-Weinberg

**Tabla 4.** Resultados de prueba  $\chi^2$  para probar equilibrio Hardy-Weinberg por cada uno de los loci analizados.

Locus	Grados de libertad	Ji -cuadrado	Probabilidad	Significancia I 5%
MICRO G	6	5,828	0,443	ns
MICRO O	15	71,254	0,000	***
MICRO Z	3	2,005	0,571	ns
MICRO X	28	318,269	0,000	***
MICRO Y	3	5,325	0,149	ns

## Análisis de Varianza Molecular (AMOVA)

La AMOVA de la Tabla 5 mostró que entre las poblaciones la varianza detectada correspondió a un 34,225% de la varianza total. Este porcentaje de variación entre las poblaciones fue altamente significativo ( $p \leq 0,001$ ), indicando que *G. angustifolia* en el Valle del Cauca tiene una gran estructura genética. Por otro lado, se observa que la diferenciación dentro de los individuos constituye el componente más alto de la varianza indicando con ello, posiblemente que los diferentes loci tienen dinámicas evolutivas diferentes, lo cual se registra cuando se observa que dos de ellos se desvían significativamente del equilibrio Hardy Weinberg (Tabla 4). A su vez, la variación intrapoblacional es muy baja, reflejada en los valores negativos no significativos obtenidos con el índice de fijación  $F_{IS}$  (Tablas 6 y 8). Por otra parte, cabe anotar la gran similitud entre los valores obtenidos en la AMOVA de ambos modelos evolutivos (Tablas 5 y 7).

**Tabla 5.** AMOVA realizada mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{st}$ ).

Fuente de Variación	d.f.	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	21	25395,391	136,352	34,225
Entre individuos dentro de poblaciones	70	7265,728	-156,267	-39,224
Dentro de individuos	92	38464,000	418,313	104,999
Total	183	71125,119	398,398	

**Tabla 6.** Índices de fijación estimados mediante el modelo de Slatkin (1995) de mutación por pasos ( $R_{st}$ ).

Índices de Fijación	Valor	Valor p
$F_{IS}$	-0,59634	1,00000

$F_{ST}$	0,34225	0,00000
$F_{IT}$	-0,04999	0,92921

**Tabla 7.** AMOVA realizada mediante el modelo de Wright

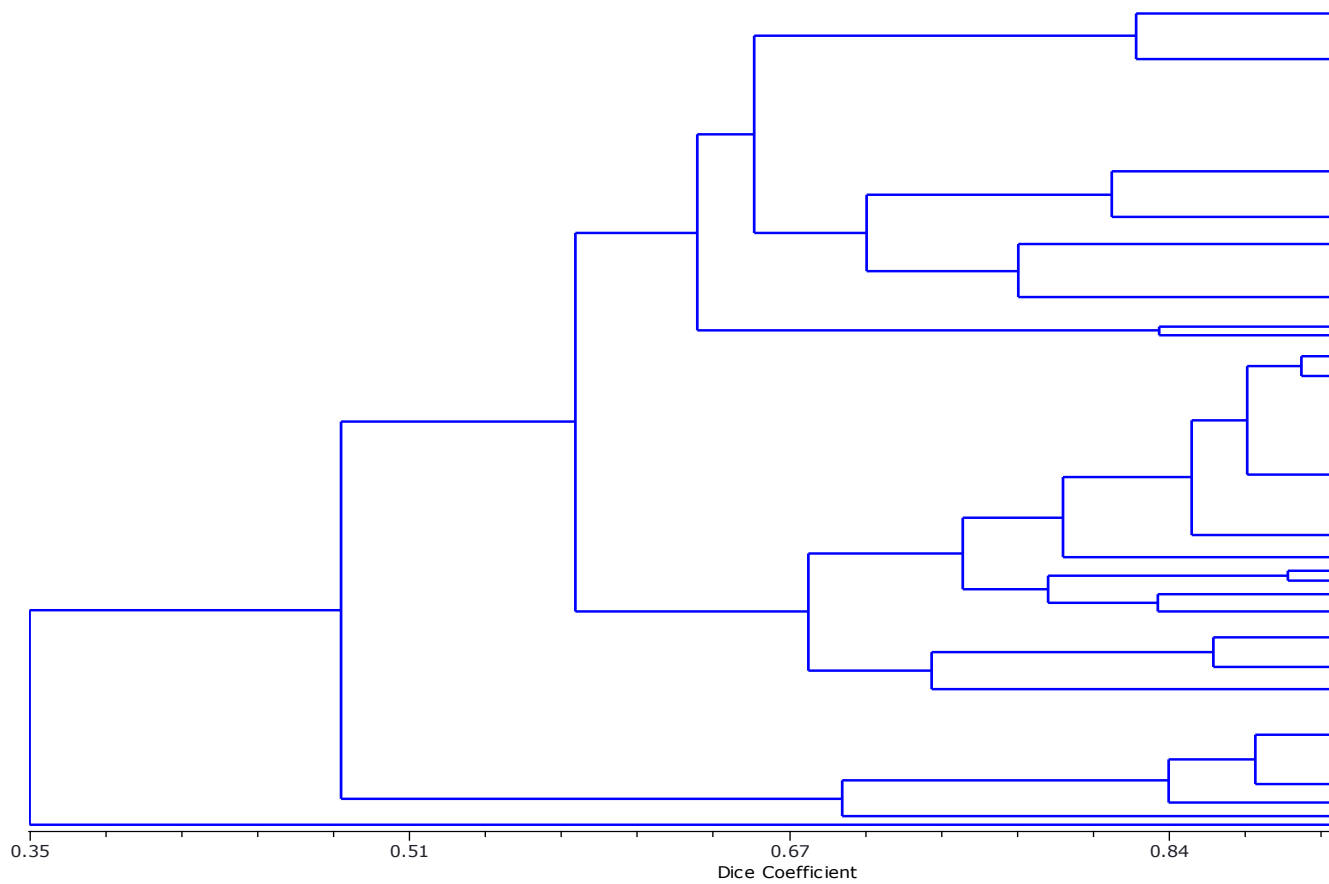
Fuente de Variación	d.f	Suma de Cuadrados	Componentes de Varianza	Porcentaje de variación
Entre poblaciones	21	92,683	0,489	35,994
Entre individuos dentro de poblaciones	70	32,554	-0,395	-0,291
Dentro de individuos	92	116,000	1,265	93,091
Total	183	241,238	1,359	

**Tabla 8.** Índices de fijación estimados mediante el modelo de Wright (1935)

Índices de Fijación	Valor	Valor p
$F_{IS}$	-0,45442	1,00000
$F_{ST}$	0,35994	0,00000
$F_{IT}$	0,06909	0,07594

### Relaciones genéticas entre los individuos

En el dendrograma obtenido por el método de agrupamiento UPGMA realizado con las distancias genéticas calculadas mediante el coeficiente de Nei-Li (1979) (Figura 1) se observa una tendencia a formarse grupos de individuos pertenecientes al mismo municipio.



**Figura 1.** Dendrograma desarrollado mediante UPGMA de las distancias genéticas calculadas mediante el coeficiente de Nei-Li (1979).

## Discusión

En este primer estudio genético poblacional desarrollado mediante un marcador codominante para la especie *Guadua angustifolia*. Se investigó la diversidad genética en 22 localidades del Valle del Cauca, la cual fue medida en términos de riqueza alélica, obteniendo un total de 24 alelos para la población total y una riqueza alélica promedio de 8.81 alelos por locus por población (localidad). Comparando estos valores con un total de 16 alelos encontrados en 190 individuos (6.5 alelos en promedio en la población con el mayor número de individuos) en el estudio de Kaneko et al. (2008) en *Bambusa arnhemica* mediante microsatélites- bambú Australiano cuyo género está muy relacionado morfológicamente al género *Guadua*, resulta ser un valor muy informativo. El estudio de Miyazaki et al. (2008) refuerza la gran riqueza alélica obtenida mediante los cinco loci en el Valle del Cauca. Ellos obtuvieron entre 2 y 8 alelos en 23 individuos con ocho loci diseñados para *Sasa nipponica* tomados de cuatro zonas diferentes en el Japón.

En los municipios de Alcalá, Palmira y Ginebra se obtuvo el promedio de alelos por locus más bajo, esto puede atribuirse a que los guaduales se encuentran en zonas altamente intervenida por el hombre mediante la explotación cañera, lo cual ha ocasionado una reducción en el tamaño efectivo de los guaduales causando probablemente erosión genética. Estos tres guaduales plantean un nuevo estudio micro geográfico en el cual se tome un mayor número de individuos como muestras para conocer la dinámica poblacional de los mismos y evitar su pérdida definitiva.

Los resultados obtenidos indican que aunque hay una gran presión antropocéntrica en el Valle del Cauca sobre la *Guadua angustifolia*, principalmente por las actividades agrícolas, se mantiene una alta diversidad genética local, lo cual permite pensar potencialmente en programas de explotación industrial y mejoramiento genético de esta especie para generar líneas elite en sus diferentes campos de utilidad teniendo en cuenta los resultados obtenidos, que sugieren ambientes heterogéneos en el desarrollo de la historia evolutiva y adaptativa de los rodales en las diferentes localidades.

Cada guadual ha quedado caracterizado genéticamente mediante la presente investigación, lo que permitirá a futuro la realización de un estudio fenológico local para establecer la relación entre los rodales de valor industrial y ambiental con los marcadores moleculares desarrollados.

## Bibliografía

CASTAÑO, F & R. D. MORENO. 2004. *Guadua* para todos, cultivo y aprovechamiento. Bogotá, Panamericana Formas e Impresos S.A. 187p.

CHASAN, R. 1991. Molecular biology and ecology: a marriage of more than convenience. *The Plant Cell*, 3 (11):1143-1145.

CRUZ, I. A. 1994. *La Guadua: Nuestro Bambú*. Armenia, Fudegraf. 293p.

FISCHBECK G. 1992. Barley cultivar development in Europe success in the past and possible changes in the future. In: Munck L (ed) *Barley genetics VI*, vol II. Munksgaard International Publishers Ltd, Copenhagen, pp 885–901.

FONTDEVILA, A & A. MOYA. 1999. *Introducción a la genética de poblaciones*. Marid, Editorial síntesis. 349p.

FRANKHAN, R., J.D. BALLOU & D.A. BRISCOE. 2002. *Introduction to Conservation Genetics*. United Kingdom, Cambridge University Press. 617p.

GUO S.W. & E. A. Thompson. 1992. "Performing the exact test of Hardy-Weinberg proportion for multiple alleles". *Biometrics*. 48: 361-72.

HEDRICK , P. W & P. S. MILLER. 1992. *Conservation Genetics: Techniques and Fundamentals*. *Ecological Applications*, 2 (1): 30-46.

HSIAO, J.-Y., AND L.H. RIESEBERG. 1994. Population genetic structure of *Yushania niitakayamensis* (Bambusoideae, Poaceae) in Taiwan. *Molecular Ecology* 3:201-208

JUDZIEWICZ EJ, CLARK LG, LONDONO X & MJ Stern. 1999. American Bamboos. Smithsonian Institution Press, Washington and London.

LONDOÑO, X. 1991. Estudio botánico, ecológico, silvicultural y económico-industrial de las Bambusoideae de Colombia. *Cespedesia* 16-17(59):51-78.

MARULANDA, M.L., P. MÁRQUEZ, & X. LONDOÑO. 2002. AFLP analysis of *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae) in Colombia with emphasis on the Coffee Region. *The Journal of the American Bambú Society* 16(1): 32-42.

MARULANDA. M. L., A. M. LOPEZ & J.L. CLAROS. 2007. Analyzing the genetic diversity of *Guadua* spp. in Colombia using rice and sugarcane microsatellites. *Crop Breeding and Applied Biotechnology* 7: 43-51.

MOLECULAR ECOLOGY RESOURCES PRIMER DEVELOPMENT CONSORTIUM. 2009. Permanent Genetic Resources added to Molecular Ecology Resources database 1 January 2009–30 April 2009.

PARK, S. D. E. 2001, Trypanotolerance in West African Cattle and the Population Genetic Effects of Selection [ Ph.D. thesis ] University of Dublin.

PEAKALL, R & SMOUSE, P.E., 2006. GENALEX 6: genetic analysis in Excel. Population genetic software for teaching and research. *Molecular Ecology Notes* 6, 288-295.

PEREZ, C. A., CARDENAS, H., GONZALEZ, I. A. 2009. Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae). *Molecular Ecology Resources* 9(5): 1375-1379.

POSTOSÍ, C. T., F. A. VALLEJO & J. D. PALACIO-MEJÍA. 2006. Estimación mediante RAPD's de la diversidad genética en guadua en el departamento del Cauca, Colombia. *Acta Agronómica* 55(2): 43-47.

RAO, V.R. & T. HODGKIN. 2002. Genetic diversity and conservation and utilization of plant genetic resources. *Plant Cell, Tissue and Organ Culture* 68: 1–19.

ROHLF, F.J. 1996. NTSYS pc: Numerical Taxonomy System, Version 2.02i. Exeter Publishing, Setauket, NY.

SCHNEIDER S, ROESSLI D, EXCOFFIER L (2000) Arlequin v. 2.000. A software for population genetic data analysis. Genetics and Biometry Laboratory. University of Geneva, Switzerland.

SISAV. 2006. Sistema de Información de Sector Agropecuario del Valle del Cauca, Colombia

<http://sisav.valledelcauca.gov.co/index.php?module=htmlpages&func=display&pid=35>

SHINGO KANEKO, S, D.C. FRANKLIN, N. YAMASAKI & Y. ISAGI.2008. Development of microsatellite markers for *Bambusa arnhemica* (Poaceae: Bambuseae), a bamboo endemic to northern Australia. *Conserv Genet* 9:1311–1313

SLATKIN, M., 1995. A measure of population subdivision based on microsatellite allele frequencies. *Genetics*



139: 457–462.

YAHIAOUI, S., E. IGARTUA, M. MORALEJO, L. RAMSAY, J. L. MOLINA-CANO, F. J. CIUDAD, J. M. LASA, M. P. GRACIA & A. M. CASA. 2008. Patterns of genetic and eco-geographical diversity in Spanish barleys. *Theor Appl Genet* 116:271–282.

YUKO MIYAZAKI , Y., N. OHNISHI, K. HIRAYAMA & J. NAGATA. 2008. Development and characterization of polymorphic microsatellite DNA markers for *Sasa senanensis* (Poaceae: Bambuseae). *Conserv Genetics Technical Note*. DOI 10.1007/s10592-008-9575-4

## Secuencias microsatélite reportadas en el GenBank para *Guadua angustifolia*

### Bam2-12 sequence

GenBank: FJ476076.1

LOCUS FJ476076 134 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-12 sequence.

ACCESSION FJ476076

VERSION FJ476076.1 GI:223585583

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 134)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 134)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..134

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-12F, fwd\_seq:  
ccttcaattagtagatagatag, rev\_name: Pbam2-12R, rev\_seq:  
gtacagaaccatctcatcct"

repeat\_region 1..134

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-12"

ORIGIN

1 gaattcggac taccttcaat tagtacatag atagataaat agatagatag atagatagat  
61 agatagatag atataggagg gtgtgttag ttggtgggat gagattgaat aggatgagat  
121 ggttctgtac tagt //

## Bam2-3 sequence

GenBank: FJ476075.1

LOCUS FJ476075 240 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-3 sequence.

ACCESSION FJ476075

VERSION FJ476075.1 GI:223585582

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 240)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 240)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (18-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..240

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-3F, fwd\_seq:

gttcctacatgtagacatatcc, rev\_name: Pbam2-3R, rev\_seq:

ctcttgggagtgagcatggtgac"

repeat\_region 1..240

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-3"

ORIGIN

1 ggttgagaca agcattttg ttctacatg tagacatatc cttatgttac tcctcaggtg

61 cgtacatgtg ggtgttcgg ggatgaactt aggaatcttc ttagcaaatg ccctgctgta

121 gatcttctat ctatctatct atctatctat ctatctatct atctatctat ctatctatca

181 atttctatt atcttataaa aataaagtca aaagaagtca ccatgctcac tccaagagt//

## Bam2-8 sequence

GenBank: FJ444936.1

LOCUS FJ444936 189 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-8 sequence.

ACCESSION FJ444936

VERSION FJ444936.1 GI:223585581

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 189)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 189)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..189

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-8F, fwd\_seq:

cccaacaaagatggtcagat, rev\_name: Pbam2-8R, rev\_seq:

caggagatgagcctgtagt"

repeat\_region 1..189

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-8"

ORIGIN

1 gactaccaa caaagatggc cagattttc tgattaacgt gggagcttc tcagagtgtt

61 taattaatat aagtatagat agatagatag atagatagat agatagatag atagatgtgt

121 gttgctgagc tctattacc acgctgatgt ccattctct cactaacagg ctcattctct

181 ggtagtccg

//

## Bam2-4 sequence

GenBank: FJ444935.1

LOCUS FJ444935 122 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION Guadua angustifolia microsatellite Bam2-4 sequence.

ACCESSION FJ444935

VERSION FJ444935.1 GI:223585580

KEYWORDS .

SOURCE Guadua angustifolia

ORGANISM Guadua angustifolia

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; Guadua.

REFERENCE 1 (bases 1 to 122)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from Guadua angustifolia (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 122)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..122

/organism="Guadua angustifolia"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-4F, fwd\_seq:

ctaggcccactcctatccca, rev\_name: Pbam2-4R, rev\_seq:

cttctcagaatgcctaatta"

repeat\_region 1..122

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-4"

ORIGIN

1 cggactacta ggcccactcc tatcccaatg tcattttaga cctcggcaaa attatctatc

61 tatctatcta tctatctatc tatctatacc tataataatt aggcattctg aggaagtagt

121 cc

//

## Bam2-6 sequence

GenBank: FJ444934.1

LOCUS FJ444934 191 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-6 sequence.

ACCESSION FJ444934

VERSION FJ444934.1 GI:223585579

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 191)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 191)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..191

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-6F, fwd\_seq:

cccgacagatagatgggtcaaa, rev\_name: Pbam2-6R, rev\_seq:

ctcatttctcaattgcgcaagag"

repeat\_region 1..191

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-6"

ORIGIN

1 gctcgaattc ggactacccg acagatagat ggtcaaatct ttctgggttaa cttgtgagct

61 ttcttataat gtagaattag ttaggtata gatagataga tagatagata gatagataga

121 tagatagata gatagataga tagatagata gatagcaaca gctcttgccg aattgagaaa

181 tgagtagtcc g

//

## Bam2-7 sequence

GenBank: FJ444933.1

LOCUS FJ444933 565 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-7 sequence.

ACCESSION FJ444933

VERSION FJ444933.1 GI:223585578

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 565)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 565)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..565

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-7F, fwd\_seq:

ctactaattggaggctccttcag, rev\_name: Pbam2-7R, rev\_seq:

gtcgtatcataatcggctttaagag"

repeat\_region 1..565

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-7"

ORIGIN

1 cggactactc ggtttgcttt ggttttgggt aaaaaattgc ttaatccttt aagtcatccc  
61 tctattttca tcctagcttt gccacttact gagaagaata gatacttcta tctatctact  
121 aattggaggc tccttcagaa accgccacgt taatcccagt taggtaaaaa aggtaataaa  
181 ttcgtacatt aatcagagaa aagaaaaaaa aagctagaaa tagccatcta agaaaaaaga  
241 aaaaggcagg gaggagacac atatctatta tctatctatc tatctatcta tctatctatc  
301 tatctatcta tctagtaatt ggagtccacg tatagtttga attaatacata tgtgtgtgac  
361 tcttaaagcc gattatgata cgacaaaaaa agaaagaaac ttaccacaca atgcatatat  
421 gtataggatt tgaaggctga cgactcaaac tcaacaataa agaaattttg acgcgttggt  
481 tacatccata atagcaatag ccgtctaaga ataaagaaag aggcagggga agatgcatag  
541 ctattatata acaattagta gtccg//

## Bam2-1 sequence

GenBank: FJ444931.1

LOCUS FJ444931 471 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-1 sequence.

ACCESSION FJ444931

VERSION FJ444931.1 GI:223585576

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 471)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 471)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..471

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-1F, fwd\_seq:

gtcaatcacgccagctctaaca, rev\_name: Pbam2-1R, rev\_seq:

tgcaagatccatacatgtcagag"

repeat\_region 1..471

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-1"

ORIGIN

1 gactacttat ataataaata tctctaaaag ttgtctatag agaaaacact aaagcattaa  
61 atttgagcat tcaatactaa cttaatcttc gtggctattg gcaaagcatt aattttaata  
121 ctaacagtca atcacgccag ctctaacatc gggttttagc caatgataac acctattttt  
181 tcgtgcgatg ctggctattg aataagagcc gggtttcttc tccatcttct ttctcactt  
241 ttccacataa aacaaaattg atttatacat actaatagta agtcctttta tatagataga  
301 tagatagata gatagataga tagatagata gatagactgc ctgcttgatga tcaagcagtt  
361 gcaagatcca tacatgtcag agtagttgag ttgttacagg gcatgcatac acattgctgg  
421 agtctgcata ggtaattaaa ctcacgattc tccatataag agtagtccga a



//

## Bam2-13 sequence

GenBank: FJ444930.1

LOCUS FJ444930 418 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-13 sequence.

ACCESSION FJ444930

VERSION FJ444930.1 GI:223585575

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 418)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 418)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (06-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..418

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_seq: ccttcacatggtctcacaag, rev\_seq:  
cagtctagcaatcaattgaag"

repeat\_region 1..418

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-13"

ORIGIN

1 aattcggact actcattggg aaggccgata gcaactaaa attgcaaatt tatttttcta  
61 aactaaaaca aactcacaca aatcgatata aatctaaca atatcaaata ctatcacac  
121 atccatacgt ttgacctca catggtctca caaggacttt ctaaagatc gttggagtag  
181 atttgttct tttactccg attaatacgg taatttctaa ttattgagag tgagtataat  
241 tttttctgt tattttaata gtataataga tagatagata gatagataga tagatagatt  
301 gtaacttgaa tttgtggtg tattgccag cccatcgaag ggggggctca ctcaaattg  
361 attgctagac tgccctacag catccgtgct gcagtgccgt ggctaagtag tccgaatt

//

## Bam2-5 sequence

GenBank: FJ444929.1  
LOCUS FJ444929 284 bp DNA linear PLN 05-APR-2010  
DEFINITION Guadua angustifolia microsatellite Bam2-5 sequence.  
ACCESSION FJ444929  
VERSION FJ444929.1 GI:223585574  
KEYWORDS .  
SOURCE Guadua angustifolia  
ORGANISM Guadua angustifolia  
Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; Guadua.  
REFERENCE 1 (bases 1 to 284)  
AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.  
TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from Guadua angustifolia (Poaceae: Bambusoideae)  
JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)  
REFERENCE 2 (bases 1 to 284)  
AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.  
TITLE Direct Submission  
JOURNAL Submitted (06-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia  
FEATURES Location/Qualifiers  
source 1..284  
/organism="Guadua angustifolia"  
/mol\_type="genomic DNA"  
/db\_xref="taxon:323898"  
/PCR\_primers="fwd\_seq: ctatgctctcctaatacaagtg, rev\_seq:  
tactaaccgattgtcccgtctag"  
repeat\_region 1..284  
/rpt\_type=tandem  
/satellite="microsatellite:Bam2-5"  
ORIGIN  
1 gaattcggac tactagatct tcctaataca agtgggaagct acctcgtaat agatagatag  
61 atagatagat agatagatag atagatagat ataaatgtga atcatatctt cattattgat  
121 tatagattga ttttctttca cagaacataa cacctctttt aatttcacta gttcggttaag  
181 tagtcacggt taattccat cgatttggtt ttgtgatttt ttccagacg atttttgta  
241 aagctagacg ggacaatcgg ttagtacaca gtagtccgaa ttcg  
//

## Bam2-2 sequence

GenBank: FJ444932.1

LOCUS FJ444932 1025 bp DNA linear PLN 05-APR-2010

DEFINITION *Guadua angustifolia* microsatellite Bam2-2 sequence.

ACCESSION FJ444932

VERSION FJ444932.1 GI:223585577

KEYWORDS .

SOURCE *Guadua angustifolia*

ORGANISM *Guadua angustifolia*

Eukaryota; Viridiplantae; Streptophyta; Embryophyta; Tracheophyta;  
Spermatophyta; Magnoliophyta; Liliopsida; Poales; Poaceae; BEP  
clade; Bambusoideae; Bambuseae; *Guadua*.

REFERENCE 1 (bases 1 to 1025)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones  
from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

JOURNAL Mol Ecol Resour 9 (5), 1375-1379 (2009)

REFERENCE 2 (bases 1 to 1025)

AUTHORS Perez-Galindo,C.A., Cardenas-Henao,H. and Gonzalez-Vargas,I.A.

TITLE Direct Submission

JOURNAL Submitted (07-NOV-2008) Quimica, Universidad Santiago de Cali,  
Calle 5ta, Cr. 62, Cali, Valle 4102, Colombia

FEATURES Location/Qualifiers

source 1..1025

/organism="*Guadua angustifolia*"

/mol\_type="genomic DNA"

/db\_xref="taxon:323898"

/PCR\_primers="fwd\_name: Pbam2-2F, fwd\_seq:

cgccacgttaatcccagttagg, rev\_name: Pbam2-2R, rev\_seq:

cctatacatatatgcattgtgtgg"

repeat\_region 1..1025

/rpt\_type=tandem

/satellite="microsatellite:Bam2-2"

ORIGIN

1 cggactactt ctcaaaatta tagcgcgtat atcgagaatt atacgctccg tcctagagat  
61 ttttaaatta catctagatc gctttcttga tgaaaaaaac ccgatttcg tattacgcca  
121 atcacgcatg ggctagtata taacacacca acaaagttag cttgtagag catcgagagc  
181 caggctaaag aagttcacct cgccacaaag ttatctgtgc ctaggcccag cagctactgt  
241 atctatttgc atattgatac gaacgcggtc cagcggatcg tggatcgca ttctcgccaa  
301 cgcgtgattc gaaagcgcca cgctcgaca tgctcgcgcc cagtaacgtt ctgtcttac  
361 gtgaacttgc agtcgttga ctccaaaaga ttacacaagt tgtgagcata atatgagcac  
421 gtatcagggt gtactttacc tttgagtgg caggcacact ggtgcgtacc ctctgcgact  
481 gagtagtccg aattcggact actttgccac ttactgagaa gaatagatac ttctatctat  
541 ctactaattg gaggctcctt cagaaaccgc cacgttaatc ccagttaggt aaaaaaggtta

601 ataaattcgt acattaatca gagaaaagaa aaaaaagcta gaaatagcca tctaagaaaa  
661 aagaaaaagg cagggaggag acacatatct attatctatc tatctatcta tctatctatc  
721 tatctatcta tctatctagt aattggagtc cacgtatagt ttgaattaat catatgttgt  
781 tgactcttaa agccgattat gatacgacaa aaaaagaaag aaacttacca cacaatgcat  
841 atatgtatag gatttgaagg ctgacgactc aaactcaaca ataaagaaat ttgacgcgt  
901 tggttacatc catantagca atagccgtct aanaataaag aannnnaggg gaagatgcat  
961 agtagtcgnn ngccctatag tgagtcgtan tnnanttcan tggnttcntt tacnangtcn  
1021 ganng

//

## PRIMER NOTE

Cloning and isolation of tetra nucleotide microsatellite clones from *Guadua angustifolia* (Poaceae: Bambusoideae)

Pérez-Galindo, P<sup>1</sup>; Carlos Andrés, C; González, G<sup>1</sup>; Iván Andrés I; Cárdenas, C<sup>1</sup>; Heiber, H.

<sup>1</sup> Basic and Environmental Sciences and Technological Development Research Center (CICBA) - Universidad Santiago de Cali, Calle 5 Cra 62 Cali, Colombia.

## Abstract

Twenty-four microsatellite loci were isolated and nine characterized from *Guadua angustifolia*. Loci were screened for variability with 23 individuals from one natural Colombian population. All loci showed polymorphism, the observed heterozygosity per locus varied from 0.27 to 1.00, the power of discrimination was 0.60–0.92 and the power of exclusion was 0.12–0.50. An average of 6.4 alleles per locus was detected. This set of microsatellites offers an efficient tool for population genetics studies on this species.

**Keywords:** polymorphism, microsatellite, *Guadua angustifolia*, conservation.

*Guadua* (Poaceae: Bambusoideae) occurs throughout tropical America, from Mexico to northern Argentina. *Guadua angustifolia* Kunth, the giant bamboo of the neotropics is native to Venezuela, Colombia and Ecuador, and has been widely introduced into other Andean and Central American countries (Judziewicz et al. 1999). In Colombia and Ecuador, it is extensively used as building material for housing (Londoño 1990), to make paper, and to make local arts and crafts (Villegas et al. 2003; Castaño & Moreno 2004; Cruz 1994).

We are reporting the characterization of nine microsatellite loci to analyze selfing rates and gene flow within and between *G. angustifolia* populations.

Leaf samples from one Colombian population were collected and dried on silica gel, and genomic DNA was extracted using the QIAGEN DNeasy Kit. DNA from one individual was used as a source of genomic clones to prepare and enrich GATA tetranucleotide markers in *G. angustifolia*. A double restriction/ligation to linker M28/M29p (5' CTCTTGCTTGAATTCGGACTA / 5' pTAGTCCGAATTCAGCAAGACACA) was performed using the Psh A1/Hae III enzymes. The ligated DNA was then denatured and hybridized with 5' biotin GATA<sub>6</sub> (at 50°C), followed by isolation with Dynal M270 beads, and amplification with M28/M29p primers. After amplification, enriched fragments were cloned through Eco RI digestion and ligation into dephosphorylated Eco RI treated pUC19, followed by electroporation into *E. coli* DB10B. For screening purposes, the colony was placed with 5'

32P-GATA<sub>6</sub> at 50°C in 5xSSPE (0.75 M NaCl, 57.5 mM NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 5 mM EDTA, pH 7.4), and then washed with fresh solution at the same temperature.

A set of 24 positive GATA clones were sequenced and ten primer pairs were tested. Sequences were obtained by amplifying an aliquot of frozen bacterial culture from positive hybridizing 32-P GATA6 colonies using the M13 forward (F) and reverse (R) primers. The amplification reactions were treated with Exonuclease I and alkaline phosphatase to remove excess primer and unincorporated deoxynucleotide triphosphates. After heat deactivation, approximately 10 ng of PCR product was sequenced using M13 forward and/or reverse primers with Applied Biosystems Big Dye V3.1 on ABI3730.

The ten primer pairs were then tested on 23 natural population individuals. The PCR products were labeled with 32-P and separated using a 10bp size standard (or better) in polyacrylamide gels, followed by autoradiography. All amplifications were done in 12.5 µL reactions containing 1X UltraTherm buffer, 1.5 mM MgCl<sub>2</sub>, 0.2 mM each dNTP (except for labeling where cold dATP is 20 nM), 0.5 mM each primer, 0.05 units Ultratherm DNA polymerase (Medicorp) and 0.0125 units Vent DNA polymerase. Typical PCR conditions were: 95 °C 3 minutes then 33-35 X (95 °C 30 sec/55 °C 30 sec/72 °C 1 minute 30 sec) and 72 °C, 5 minutes, in MJ Research PTC-100 thermocyclers.

Of the ten loci investigated, one turned out to be multilocus and was excluded from this article due to the high level of complexity of its analysis. The characteristics of the nine remaining primer pairs and their optimal conditions for amplification are given in Table 1. We estimated the number of alleles per locus, observed and expected heterozygosity, polymorphic information content, and null allele frequencies using Pm of Chakraborty (1992) calculated with MS-Excel® and verified using Identity 1.0 (Wagner and Sefc 1999).

None of the loci were found to be in Hardy-Weinberg disequilibrium (Hedrick 1992), even after the application of the Bonferroni multiple test ( $P > 0.05$ ). No linkage was detected among the 36 pairs of loci compared. Furthermore, the low combined probability of identity (0.000007664), and the high levels of discrimination power (Pd; Table 1) of most microsatellite loci suggest their use in inter- and intrapopulation genetic studies. Finally, BLAST searches of the primer indicated no similarity with any published sequences, suggesting that the given primers are highly specific.

56 The present paper presents nine polymorphic microsatellites for *G. angustifolia*, which can be used as molecular markers in population genetic  
57 analysis to assess selfing rates within populations.  
58

59

#### 60 Acknowledgements

61 To the Basic and Environmental Sciences and Technological Development Research Center (CICBA) of the Universidad Santiago de Cali, for the  
62 grant which made this research possible. To the Institute for research and preservation of the cultural and natural equity of the Cauca River Valley  
63 province (INCIVA), and to the Alexander Von Humboldt Institute for its logistic support.  
64

65

#### 66 References

67

68 Castaño F, Moreno RD (2004) *Guadua para todos, cultivo y aprovechamiento*, Panamericana Formas e Impresos S.A. Bogotá.

69

70 Cruz H (1994) *La guadua: Nuestro Bambú*. Corporación Autónoma Regional del Quindío, CRQ. Colombia.

71

72 Chakraborty RM, De Andrade SP, Budowle B (1992) *Apparent heterozygote deficiencies observed in DNA typing data and their implications in*  
73 *forensic applications*. Annals of Human Genetics, 56, 45-57.

74

75 Hedrick PW, Miller PS (1992) *Conservation Genetics: Techniques and Fundamentals*. In: *Ecological Applications*, Vol. 2 No. 1, pp. 30-46.

76

77 Judziewicz E, Lynn C, Londoño X and Stern M. (1999) *American Bamboos*. Smithsonian. 392p. Institution Press, Washington,

78

79 Londoño X (1990). *Aspectos sobre la Distribución y la Ecología de los Bambúes de Colombia*. (Poaceae: Bambusoideae), 77, pp. 139 - 153.

80

Caldasía. Cali.

81

82 Villegas M, Villegas B, Villegas L, Londoño X (2003) *Guadua: arquitectura y diseño*. 208p. Villegas editores. Colombia.

83

84 Wagner HW, Sefc KM (1999) IDENTITY 1.0. Centre for Applied Genetics, University of Agricultural Sciences. Vienna.

85

**Table 1** Characterization of nine polymorphic microsatellite loci for *Guadua angustifolia*. Size indicates the range of observed alleles in base pair. A total of 23 individuals from one natural population from the city of Túhuí (Cauca River Valley province - Colombia) were screened.

Locus accession No.	Primer sequence 5'-3' F: forward / R: reverse	Repeat motif	Bp Size	Td	k	n	Minimal allelic frequency	Ae	Null alleles	Ho	He	PIC	f	pM	Pd	PE
FJ444930	R: CCTTCACATGGTCTCACAAG F: CAGCTAGCAATCAATTGGAAG	(GATA) <sub>8</sub>	225-270	55	7	6	0.0950	1.6729	0.0028	0.4000	0.4022	0.3786	0.0055	0.3956	0.6044	0.1153
FJ444929	R: CTAGATCTTCCTAATCAAAGTGG F: TACTAACCGATTGTCCCGTCTAG	(GATA) <sub>10</sub>	240-260	48	8	7	0.0950	2.9900	-0.0008	0.6667	0.6656	0.6066	-0.0017	0.2533	0.7467	0.3770
FJ444932	R: CGCCACGTTAATCCCGATTAGG F: CCTATACATATATGCAATTGTGTGG	(CTAT) <sub>10</sub>	450-500	54	4	5	0.0950	1.7717	0.2405	0.2667	0.4356	0.3775	0.3878	0.4044	0.5956	0.1371
FJ476075	R: GTTCTACATGTAGACATATCC F: CTCTGGGAGTGAGCATGGTGAC	(CTAT) <sub>13</sub>	175-195	48	5	5	0.0950	1.6544	0.0854	0.3333	0.3956	0.3561	0.1573	0.4133	0.5867	0.1112
FJ444934	R: CCGACAGATAGATGGTCAAA F: CTCATTTCTCAATTGCGCAAGAG	(GATA) <sub>16</sub>	170-190	50	8	8	0.0950	3.8136	0.2251	0.4667	0.7378	0.6612	0.3675	0.1911	0.8089	0.4891
FJ444931	R: GTCAATCACGCCAGCTCTAACA F: CTCTGACATGATGGATCTTGCA	(GATA) <sub>16</sub>	225-275	50	9	12	0.0950	6.0811	-0.0896	1.0000	0.8356	0.7967	-0.1968	0.0933	0.9067	0.6666
FJ444936	R: CCCAACAAAGATGGTCAGAT F: CAGGAGATGAGCCTGTTAGT	(GATA) <sub>8</sub>	180-220	55	9	5	0.1926	7.0000	-0.0769	1.0000	0.8571	0.8259	-0.1667	0.2653	0.7347	0.7090
FJ444935	R: CTAGGCCCACTCCTACTCCA F: AGCTTCCTCAGAATGCCTAATTA	(CTAT) <sub>8</sub>	210-260	55	3	4	0.1707	2.6667	0.1111	0.5000	0.6250	0.4844	0.2000	0.2813	0.7188	0.3220
FJ476076	R: CCTTCAATTAGTACATAGATAG F: GTACAGAACCATCTCATCCT	(GATA) <sub>8</sub>	230-255	55	4	4	0.1707	3.6571	-0.0927	0.8750	0.7266	0.6235	-0.2043	0.3438	0.6563	0.4705

Td = Initial annealing temperature for amplification  
k = Number of alleles (3-9)

n = Number of the genotypes obtained

Ae = Effective Number of Alleles

Ho = Observed heterozygosity

He = Expected heterozygosity

f = Inbreeding coefficient

pM = Matching Probability

Pd = Discrimination Power

PE = Exclusion Probability

PIC = Polymorphic Information Content